

Phosphorylierung von Thyreoglobulin:
Nachweis und mögliche Bedeutung für den
zellulären Transport

Wolfgang Neumüller





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0107

Aus dem Institut für Zellbiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Phosphorylierung von Thyreoglobulin:

Nachweis und mögliche Bedeutung für den zellulären Transport

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Wolfgang Neumüller

aus

Bad Reichenhall
München, Dezember 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve

2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Linzen

Sonderberichterstatter: Prof. Dr. V. Herzog

Tag der mündlichen Prüfung: Freitag, 13. Mai 1988

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Veröffentlichung
verwendet:

Herzog, V., Neumüller, W., Holzmann, B. (1987):

Thyroglobulin, the major and obligatory exportable protein of
thyroid follicle cells, carries the lysosomal recognition
marker mannose-6-phosphate

EMBO J. 6, 555-560

1.) Einleitung	7
2.) Material und Methoden	11
2.1.) Material	11
2.1.1.) Chemikalien und Proteine	11
2.1.2.) Zusammensetzung der Medien	14
2.1.3.) Gewebe	15
2.2.) Methoden	16
2.2.1.) Zell- und Gewebekulturen	16
2.2.1.1.) Inside-out - Follikel	16
2.2.1.2.) Monolayer - Kulturen	18
2.2.1.3.) Mini-organ - Kulturen	18
2.2.2.) Nachweis von phosphoryliertem Sekretionsprodukt in situ	19
2.2.3.) Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
2.2.4.) Fluorographie von TG nach Gelelektrophorese	21
2.2.5.) Ausschluß extrazellulärer Phosphorylierung	21
2.2.5.1.) Mikrosomenpräparation und Lyse von Mini-Organen	21
2.2.5.2.) Immunpräzipitation von TG	22
2.2.6.) Isolierung von TG unter phosphatfreien Bedingungen	23
2.2.7.) Enzymatische Behandlung von TG	25

2.2.8.) Colorimetrische Bestimmung des	
Phosphatgehaltes von TG	26
2.2.9.) Proteinbestimmung	28
2.2.10.) Enzymatischer Nachweis von M6P	30
2.2.10.1.) Hydrolyse des TG	30
2.2.10.2.) Durchführung der Bestimmung	31
2.2.11.) Direkter Nachweis von M6P	32
2.2.11.1.) Präparation radiophosphorylierter	
Zuckerketten	32
2.2.11.2.) Analyse der M6P-haltigen	
Seitenketten	33
2.2.12.) Bindung von ^{125}I -TG an CHO-Zellen	34
2.2.12.1.) Jodierung von TG	34
2.2.12.2.) Bindungsexperimente	35
2.2.12.3.) Lyse der Zellen und	
Radioaktivitätsbestimmung	36
2.2.13.) Nachweis von phosphorylierter Neuraminsäure	36
2.2.14.) Ausschluß von Phosphotyrosin	37
2.2.15.) Einfluß von DCNP auf den Export von TG	38
2.2.15.1.) Reduktion der Sulfatierung von TG	38
2.2.15.2.) Export von TG unter Einwirkung	
von DCNP	39
2.2.15.3.) Quantitative DNA-Bestimmung	40
2.2.15.4.) Effekt von DCNP auf die	
Proteinsynthese	41

3.) Ergebnisse	43
3.1.) Nachweis der Phosphorylierung von Thyreoglobulin mittels Autoradiographie	43
3.2.) Zelluläre Lokalisation der Phosphorylierung	46
3.3.) Quantitative Analyse des Phosphatgehaltes von nativem und enzymbehandelten TG	46
3.4.) Nachweis von Mannose-6-Phosphat	49
3.4.1.) Enzymatische Bestimmung von Mannose-6-Phosphat	49
3.4.2.) Nachweis von radiomarkiertem Mannose-6-Phosphat	50
3.4.3.) Bindung von Thyreoglobulin an CHO-Zellen	53
3.5.) Nachweis phosphorylierter Neuraminsäure	54
3.6.) Ausschluß von Tyrosinphosphat	56
3.7.) Export von TG bei gehemmter Synthese von Tyrosinsulfat	57
4.) Diskussion	61
4.1.) Zur intrazellulären Lokalisation der Phosphorylierung	61
4.2.) Quantifizierung und Lokalisation der Phosphatreste auf dem TG-Molekül	63
4.3.) Mögliche Funktionen des Phosphates	64
4.3.1.) Strukturbestimmende Funktionen	64

4.3.2.) Mögliche Transportfunktionen	65
4.3.2.1.) Das lysosomale M6P-Signal	66
4.3.2.2.) Mögliche Signalfunktion der Phosphoneuraminsäure	69
4.4.) Bedeutung der Sulfatierung von Tyrosin	73
4.5.) Funktionelle Implikationen der TG-Struktur	74
5.) Zusammenfassung	76
6.) English Summary	78
7.) Literaturverzeichnis	80

1.) EINLEITUNG

Ein wesentliches Merkmal eukaryonter Zellen ist ihre ausgeprägte Kompartimentierung, d.h. die Ausbildung charakteristischer, membranbegrenzter Reaktionsräume mit definierten Funktionen innerhalb des Cytoplasmas. Als Folge dieser Unterteilung ergibt sich für die Zelle das Problem des gerichteten Transportes neu synthetisierter Zellbestandteile, etwa von Proteinen, zu ihrem jeweiligen Bestimmungsort.

Proteine, die den sogenannten "sekretorischen Transportweg" (secretory pathway) einschlagen - hierunter fallen nicht nur exportable Proteine, sondern auch solche, deren Bestimmungsort eines der am sekretorischen Transportweg beteiligten Kompartimente ist, sowie lysosomale Proteine - werden an membran- gebundenen Polysomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert und bereits während ihrer Synthese (oder unmittelbar danach) in das Lumen des ER transloziert. Hier werden sie gegebenenfalls durch Übertragung einer zunächst einheitlichen, mannosereichen Zuckerkette auf bestimmte Asparaginreste glykosyliert (Robbins et al. 1977). Vom ER gelangen die Proteine durch vesikulären Transport zum Golgi-Komplex, wo verschiedenartige Modifikationen erfolgen können: Bearbeitung der Zuckerseitenketten durch Abspaltung und Anfügung bestimmter Zuckermoleküle ("terminale Glykosylierung"), Phosphorylierung und Sulfatierung sowohl des Proteinrückgrates als auch der gebundenen Zucker u.a.m..

Im Golgi-Apparat erfolgt auch das "Sortieren" (sorting) der

verschiedenen Proteine nach ihrem jeweiligen Bestimmungsort. Nur sehr wenig ist bisher über die Erkennungssignale für das Sortieren, und damit für den Transportweg, der Proteine eines bestimmten Kompartimentes bekannt:

Proteine, die im ER verbleiben, enthalten am Carboxyterminus die Aminosäuresequenz Lys-Asp-Glu-Leu (Munro und Pelham 1987).

Als Sortierungssignal lysosomaler Enzyme gilt der Zucker Mannose-6-Phosphat (M6P), in bestimmter Konfiguration terminal an eine Zuckerseitenkette des mannosereichen Typs gebunden (Kaplan et al. 1977, Natowicz et al. 1983). Erste Hinweise hierauf lieferte eine Stoffwechselkrankheit, die Mucopolidose II oder I-cell disease, bei der aufgrund eines Enzymdefektes die Phosphorylierung der Mannosereste nicht erfolgt. Dies hat zur Folge, daß in verschiedenen Zelltypen mehrere lysosomale Enzyme nicht zu Lysosomen transportiert, sondern sezerniert werden (Leroy und DeMars 1967; Kornfeld 1986).

Auch Thyreoglobulin (TG), das aus zwei identischen Untereinheiten bestehende Vorläuferprotein (MW = 670000) der Schilddrüsenhormone, durchläuft den sekretorischen Transportweg und erfährt dabei mehrere posttranslationale Modifikationen (Abb.1): Es wird im Golgi-Komplex terminal glykosyliert, wobei ein Teil seiner Zuckerseitenketten durch Abspalten von Mannoseresten und Anfügen verschiedener anderer Zucker, wie Neuraminsäure, von der mannose-reichen in die sog. "komplexe" Form umgewandelt wird (Spiro und Spiro 1966, Tsuji et al. 1981, Yamamoto et al. 1981). Ferner werden sowohl Tyrosinreste als auch bestimmte Mannosemoleküle der verbliebenen mannosereichen Zuckerketten sulfatiert (Herzog 1985a und b). Vom Golgi-Apparat aus wird das TG-Molekül zur apikalen

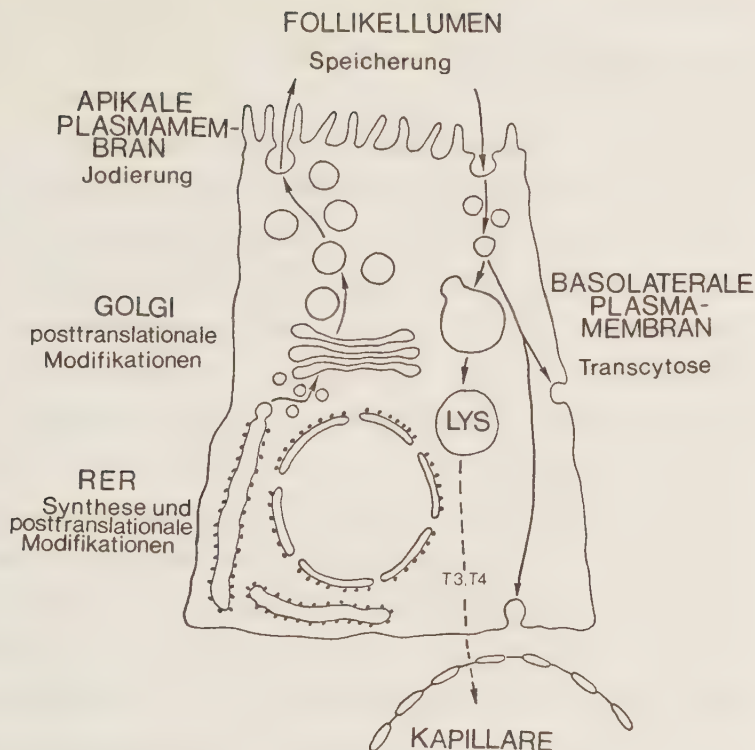


Abb.1)

Bidirektionaler Transportweg des TG (Einzelheiten siehe Text): TG wird am ER der Schilddrüsenfollikelzelle synthetisiert und über die Membran des ER in dessen Lumen transloziert. Auf seiner Exportroute (linker Teil der Abbildung) folgt das TG dem sekretorischen Transportweg und wird dabei in verschiedener Weise modifiziert. Die Jodierung von Tyrosinresten, die wichtigste Bedingung für die Hormonogenese, findet erst an der apikalen Plasmamembran, während der Freisetzung des Proteins in das Lumen der Schilddrüsenfollikel, statt. Zur Hormonproduktion wird das gespeicherte TG endozytiert, zu Lysosomen transportiert und dort abgebaut (rechter Teil der Abbildung). Die dabei freigesetzten Schilddrüsenhormone (T_3 und T_4) gelangen auf noch unbekannte Weise in den Kreislauf. Ein geringer Anteil des in die Zelle aufgenommenen TG wird an der basolateralen Plasmamembran in den Interzellularraum abgegeben (Transcytose).

Membran der Schilddrüsenfollikelzelle transportiert, wo die Jodierung von Tyrosinresten stattfindet (Ekholm und Wollman 1975), eine Voraussetzung für die Bildung der Schilddrüsenhormone. Das jodierte TG wird extrazellulär - in den Follikellumina - gespeichert, bei Bedarf endozytiert und zu Lysosomen transportiert, wo die proteolytische Freisetzung der Schilddrüsenhormone erfolgt. Etwa 10% des wiederaufgenommenen TG entgehen dem lysosomalen Abbau, indem sie durch die Zelle hindurch zur basolateralen Plasmamembran transportiert und dort in intakter Form in den Extrazellulärraum abgegeben werden (Transcytose, Herzog 1983; Roitt und Torrigani 1967).

Die vorliegende Untersuchung erbringt den Nachweis der Phosphorylierung als einer weiteren posttranslationalen Modifikation des Thyreoglobulins. Die Natur der phosphorylierten Bestandteile wird untersucht und die Ergebnisse im Hinblick auf eine mögliche Rolle dieser Verbindungen bei der Regulation des Transportes des TG diskutiert. Daneben soll, nachdem TG Tyrosin-Sulfat enthält und die Hypothese vorgebracht worden ist, daß dieses als Exportsignal sekretorischer Proteine fungiert (Hille et al. 1984), überprüft werden, ob eine Reduktion des Tyrosinsulfatgehaltes des TG tatsächlich in einer Exporthemmung resultiert.

2.) MATERIAL UND METHODEN

2.1.) Material

2.1.1.) Chemikalien und Proteine

Sofern nicht anders angegeben, entsprechen alle aufgeführten Chemikalien dem Reinheitsgrad "pro analysi".

B-N-Acetylglucosaminidase (aus <i>Canavalia ensiformis</i>)	Sigma Chemie (München), Nr.A-2264
Acrylamid	Serva (Heidelberg), Nr. 10675
Albumin (Rind, Fraktion V)	Sigma Chemie, Nr. 4503
Alkalische Phosphatase (aus Rinderniere)	Sigma Chemie, Nr. P-6028
Amidoschwarz 10B	Merck (Darmstadt), Art. 1167
Ammoniumheptamolybdat	Merck, Art. 1182
Amphotericin B	Flow Lab. (Bonn), Nr. 16-723-46
Antipain (Dihydrochlorid)	Sigma Chemie, Nr. A-6217
Aprotinin	Sigma Chemie, Nr. A-1153
L(+)-Ascorbinsäure	Merck, Art. 127
Bromphenolblau	Serva, Nr. 15375
Coomassie-Blau	Sigma Chemie, Nr. B-0630
DCNP (2,6-Dichlor-4-nitrophenol)	Aldrich-Chemie (Steinheim), Nr. D 6, 920-3
Diphenylamin	Serva, Nr. 20563
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Art. 802912
DNA (Desoxyribonucleinsäure)	Sigma Chemie, Nr. D-1501

Endo-D	ICN Biomedicals (Eschwege),
(Endo- β -N-acetylglucosaminidase D)	Nr. 32-128-2
Endo-H	ICN Biomedicals, Nr. 39-131
(Endo- β -N-acetylglucosaminidase H)	
Epon 812	Polaron Equipment Ltd. (London)
FCS (Fötales Kälberserum)	Sebio, Walchsing,
	Nr. 10017 Ch.-B. 39072
G6P-DH (Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase)	Boehringer Mannheim, Nr. 127043
D(+)-Galaktose-6-Phosphat	Sigma Chemie, Nr. G-1750
β -Galactosidase	Sigma Chemie, Nr. G-9132
(aus <i>Aspergillus niger</i>)	
Glycin	Karl Roth KG (Karlsruhe) Nr. 3908
Glutaraldehyd (70%)	Ladd Research Ind., Burlington,
	Vt., USA
^{125}I (als NaI)	New England Nuclear (Dreieich),
	Nr. NEZ 033L
HEPES (freie Säure)	Sigma Chemie, Nr. H-9136
Kollagenase	Boehringer Mannheim, Nr. 103586
L-(4,5- ^3H)-Leucin	Amersham Buchler GmbH & Co. KG
	(Braunschweig), Nr. TRK. 754
Magnesiumnitrat (suprapur)	Merck, Art. 5855
D(+)-Mannose	Sigma Chemie, Nr. M-4625
D(+)-Mannose-1-phosphat	Sigma Chemie, Nr. M-1755
D(+)-Mannose-6-phosphat	Sigma Chemie, Nr. M-6876
α -Mannosidase	Sigma Chemie, Nr. M-7257
(aus <i>Canavalia ensiformis</i>)	

MEM (Minimum Essential Medium Eagle)	Boehringer Mannheim, Nr. 209996
MEM, leucinfrei	Gibco International Ltd. (Paisley, GB), Cat. No. 041-1890
β -Mercaptoethanol	Serva, Nr. 28625
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Nr. 29195
Molybdänblau-Sprühreagenz	Sigma Chemie, Nr. M-3389
di-Natriumhydrogenphosphat (suprapur)	Merck, Art. 6566
Neuraminidase (aus <i>Vibrio cholerae</i>)	Behring (Marburg), Nr. ORKD 1133
Osmium (VIII)-Oxid (LAB)	Merck, Art. 24505
^{32}P (als H_3PO_4)	New England Nuclear, Nr. NEX 054
^{33}P (als Na_2HPO_4)	New England Nuclear, Nr. NEZ 114
Pepstatin A	Sigma Chemie, Nr. P-4265
PGI (Phosphoglucoseisomerase)	Boehringer Mannheim, Nr. 127396
Phosphomannoseisomerase	Boehringer Mannheim, Nr. 131202
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma Chemie, Nr. P-7626
Poly-L-Tyrosin	Sigma Chemie, Nr. P-7887
PPO (2,5-Diphenyloxazol)	Packard Instr. International (Zürich), Cat. No. 6002023
Protein A - Sepharose CL-4B	Sigma Chemie, Nr. P-3391
RPMI-1640-Medium	Boehringer Mannheim, Nr. 210200
^{35}S (als Na_2SO_4)	New England Nuclear, Nr. NEX 041
SDS (Na-Dodecylsulfat)	Sigma Chemie, Nr. L-5750
Sepharose CL-4B	Pharmacia (Uppsala, SW), Code-No. 17-0150-01

Streptomycin-Penicillin	Boehringer Mannheim, Nr. 210404
TAME (N ^ε -Tosyl-L-Arginin-Methylester, Hydrochlorid)	Sigma Chemie, Nr. T-4626
TEA (Triethanolamin-hydrochlorid)	Merck, Art. 8357
TMED (N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin)	Serva, Nr. 35925
Trasylol 100000 KIE	Bayer AG (Leverkusen), Nr. 48764
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan	Karl Roth KG, Nr. 4855
Triton X-100	Sigma Chemie, Nr. T-6878
TSH (Thyrotropin)	Organon Teknika (Oberschleisheim), Reg.Nr. T 525

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Chemikalien stammten von der Firma Merck AG (Darmstadt) und entsprachen dem Reinheitsgrad "pro analysi".

2.1.2.) Zusammensetzung der Medien

Die Medien (MEM, RPMI 1640, siehe 2.1.1.) enthielten bereits 1 mg/ml Glucose; sie wurden mit folgenden Zusätzen versehen:

Natriumbicarbonat	22 mg/ml
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Amphotericin B	0,5 µg/ml

Die kompletten Kulturmedien für die Anzucht von Zellen oder Geweben enthielten außerdem 10 % FCS. Für experimentelle Inkubationen wurde MEM ohne FCS verwendet.

Zur Herstellung von phosphat- bzw. sulfatfreiem MEM wurden die Bestandteile des Mediums als Trockensubstanzen abgewogen und bei phosphatfreiem MEM das NaH_2PO_4 durch die entsprechende (molare) Menge an NaCl ersetzt, bei sulfatfreiem MEM das MgSO_4 durch MgCl_2 .

2.1.3.) Gewebe

Die Schweineschilddrüsen stammten vom Schlachthof München. Die Schweine (6-8 Monate, 80-90 kg, weiblich) wurden durch Ausbluten unter Elektroschockanästhesie getötet. Etwa 10 Min. nach der Tötung wurden die Schilddrüsen entnommen und auf Eis zum Labor gebracht, wo sie sofort für die Herstellung von Kulturen oder zur Proteinisolation weiterverarbeitet wurden.

Zur Herstellung von Miniorgankulturen (siehe 2.2.1.3.) wurden auch Schilddrüsen aus Mäusen (20-40 g, männlich) präpariert, die aus den Beständen des Instituts für Zellbiologie stammten und durch Ausbluten in Äthernarkose getötet wurden.

2.2.) Methoden

2.2.1.) Zell- und Gewebekulturen

Drei verschiedene In vitro - Kultursysteme fanden, abhängig vom Ziel der jeweiligen Untersuchung, Verwendung:

- 1.) Zur Gewinnung isolierten Sekretionsproduktes, etwa nach Radiomarkierung, dienten Inside-out - Follikel von Schilddrüsengewebe. In Suspensionskultur gehaltene Gewebefragmente schließen sich wieder zu Follikeln mit umgekehrter Polarität: die apikale Zelloberfläche weist hier also nach außen; demzufolge wird auch neusynthetisiertes TG nach außen, in das Kulturmedium, abgegeben und kann durch Abzentrifugieren der Follikel einfach und in hochreiner Form von diesen getrennt werden.
- 2.) Monolayer-Kulturen erwiesen sich für Studien zur Messung der Bindung von radiomarkiertem TG an die apikalen Zelloberflächen von Thyreozyten und CHO-(Chinese Hamster Ovary-)Zellen am geeignetsten.
- 3.) Zum Nachweis von phosphoryliertem Sekretionsprodukt in situ sowie zur intrazellulären Lokalisation der Phosphorylierung von TG wurden Mini-Organ-Kulturen von Schilddrüsengewebe verwendet.

2.2.1.1.) Inside-out - Follikel

Die Präparation von Inside-out - Follikeln folgte der Vorschrift von Herzog (1983b). Schilddrüsengewebe wurde bei Raumtemperatur mit entfetteten Rasierklingen von Bindegewebe und Fett befreit und in kleine Fragmente mit einem Durchmesser von 0,5-1,0 mm geschnitten. Die Fragmente wurden in MEM ohne FCS-Zusatz mehrmals

gewachsen, bis der Überstand klar war. Die Gewebebrocken wurden auf mehrere kleine, silikonisierte Glaskolben verteilt, der Überstand abgezogen und durch MEM mit 150 mU/ml Kollagenase (etwa 10 ml pro Gefäß) ersetzt. In diesem Medium wurden die Fragmente unter langsamem Schwenken 30 Min. bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Gewebefragmente durch silikonisierte Pasteurpipetten mit schrittweise immer kleinerem Spitzendurchmesser (1200 µm - 600 µm) pipettiert. Verbliebenes Bindegewebe und allzu große Gewebstücke wurden hierbei verworfen. Anschließend wurde die Suspension durch 250µm - Nylongaze (Schweizerische Seidengazefabrik, Zürich) filtriert und für 30 Sek. bei 70 g in einer Labofuge II (Heraeus-Christ GmbH, Osterode) zentrifugiert. Das Sediment wurde in frischem MEM aufgenommen, durch Gaze mit einer Lochweite von 150 µm filtriert und nochmals zentrifugiert. Zur Gewinnung von Inside-out - Follikeln wurden die Gewebefragmente in MEM mit 10 % FCS steril gewaschen und in diesem Medium in hydrophoben Petriperm-Kulturschalen (Heraeus GmbH, Hanau; Best. Nr. 26.136.906) mit gasdurchlässigem Boden bei 37° C inkubiert. Der Kohlendioxidgehalt innerhalb des Brutschrankes wurde auf 5% eingestellt. Unter diesen Kulturbedingungen bilden sich intakte Inside-out - Follikel binnen 24 h. Zur Stimulation der Synthese und Sekretion von TG wurde das Kulturmedium gegebenenfalls mit 50 mU/ml TSH versetzt.

2.2.1.2.) Monolayer - Kulturen

Monolayer-Kulturen von Schilddrüsenfollikelzellen wurden angelegt, indem Gewebefragmente wie unter 2.2.1.1. beschrieben präpariert, jedoch in hydrophilen Nunclon-Kulturschalen mit einem Durchmesser von 6 cm (Nr. 150288, Renner GmbH, Dannstadt) ausgesät wurden. Unter den oben angegebenen Kulturbedingungen waren konfluente Zellrasen von Thyreozyten nach etwa 1 Woche ausgebildet.

Zum Anlegen von CHO-Monolayern wurden die in 60 % RPMI 1640 mit 20 % DMSO und 20 % FCS in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen (jeweils 1 ml) binnen 2-3 Min. bei 37° C aufgetaut, mit sterilfiltriertem RPMI-Medium mit 10 % FCS gewaschen und in hydrophilen Kulturschalen kultiviert. 1 ml Zellsuspension (ca. 10^7 Zellen) reichte für etwa 6 Kulturschalen. Konfluente Monolayer bildeten sich hier binnen 2-3 Tagen aus.

2.2.1.3.) Mini-Organ - Kulturen

Die steril gewaschenen Gewebestücke mit einem Durchmesser von 0,5 - 1,0 mm wurden in hydrophoben Kulturschalen (siehe 2.2.1.1.) in einem Brutschrank mit regulierbarer Gaszufuhr (Modell B 5060 EK/02; Heraeus GmbH, Hanau) und Sauerstoffelektrode bei 37° C inkubiert. Um Schädigungen des Gewebes zu vermeiden, mußte die Sauerstoffkonzentration auf 50 % erhöht werden. Ferner wurde die Glucosekonzentration auf 5,56 mM erhöht. Der pH-Wert des Mediums wurde durch Zusatz von 0,05 % HEPES und Einstellung der Kohlendioxidkonzentration auf 5-6 % konstant bei 7,35 gehalten. Diese

Bedingungen ermöglichten eine Haltung der Kulturen über mehrere Wochen hinweg.

2.2.2.) Nachweis von phosphoryliertem Sekretionsprodukt in situ

Mini-Organe wurden in phosphatfreiem MEM mit 1 mCi/ml $^{33}\text{PO}_4^{3-}$ inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten (1-24 h) wurden Proben entnommen, in gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und 1 h in Karnovskys Fixans (Karnovsky 1965) fixiert. Das Gewebe wurde 1 h in 1% ungepufferter Osmium(VIII)-Oxidlösung nachfixiert, dann in absolutem Äthanol dehydriert (dreimal je 10 Min.). Der Alkohol wurde durch dreimalige Inkubation in Propylenoxid (1 x 20 Min., 2 x 10 Min.) aus dem Gewebe entfernt. Anschließend wurden die Mini-Organe über Nacht bei 4° C in einem 1:1 Gemisch (v/v) von Propylenoxid und Epon belassen. Nach dem Erwärmen wurden die Proben unter langsamen Rotieren 2-3 h bei Raumtemperatur inkubiert, in Epon überführt, abermals 2 h inkubiert und schließlich eingebettet. Das Kunstharz wurde 24 h bei 37° C und weitere 24 h bei 60° C ausgehärtet. Schnitte mit einer Dicke von 1 µm wurden auf Glasobjektträger aufgebracht und mit Röntgenfilmemulsion K 5 (Ilford Ltd., Essex, GB) überschichtet.

Zur Ermittlung der maximalen radioaktiven Streuweite wurde eine Suspension von Myelomzellen für 24 h wie oben beschrieben mit $^{33}\text{PO}_4^{3-}$ inkubiert, fixiert und eingebettet. 1µm - Schnitte wurden in Epon eingebettet und Schnitte in der dazu senkrechten Ebene angefertigt. Von diesen wurden Autoradiographiepräparate angefertigt.

Nach Expositionszeiten von 5-7 Tagen wurde die Filmemulsion

entwickelt. Die ungefärbten Präparate wurden in einem Photomikroskop Ultraphot III (Zeiss AG, Oberkochen) in Phasenkontrast untersucht.

2.2.3.) Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erfolgte nach der Methode von G. Scheele (Rockefeller University, N.Y., USA).

Die verwendete Acrylamidstammlösung war 30 %ig mit einem Anteil von 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid. Als Trenngel diente ein Gradientengel (5-15 % Acrylamid) in 0,4 M Tris-Puffer, pH 8,8, von 1 mm Dicke. Das Sammelgel war 3,5 %ig in 0,06 M Tris-Puffer, pH 6,8. Die SDS-Konzentration betrug jeweils 0,1 %, die Lösungen enthielten ferner 0,043 % TMED. Die Polymerisationsreaktion wurde durch Zugabe von 0,025 % Ammoniumperoxidisulfat in Gang gesetzt. Die aufzutragenden Proben (maximales Gesamtvolumen jeweils 60 µl) wurden mit 30 µl 60 % Saccharoselösung und 5 µl Bromphenolblau (0,1%) versetzt. Der Lauf wurde für 16 h bei 250 V und 25 mA durchgeführt. Als Elektrodenpuffer diente eine 50 mM Tris-Lösung mit 384 mM Glycin und 0,1 % SDS.

Nach dem Lauf wurde das Gel 2 h in einem Fixier-Färbebad aus Methanol/Eisessig/Wasser (25 : 5 : 20) mit 0,17 % Coomassie-Blau inkubiert und anschließend 5 h lang in einem Gemisch aus Methanol/Eisessig/Glyzerin/Wasser (35 : 10 : 5 : 50) entfärbt. Das fertige Gel wurde auf Whatman 3MM - Papier (Hormuth-Vetter, Wiesloch) aufgelegt und getrocknet.

2.2.4.) Fluorographie von TG nach Gelelektrophorese

Das fixierte und enfärbte Gel wurde 2 x 30 Min. in DMSO, danach 4 h in PPO (22% in DMSO) inkubiert und schließlich mit entionisiertem Wasser gespült. Die radioaktiven Banden wurden durch Belichtung eines Röntgenfilmes (Hyperfilm Betamax; Amersham Buchler GmbH, Braunschweig) sichtbar gemacht.

2.2.5.) Ausschluß extrazellulärer Phosphorylierung

2.2.5.1.) Mikrosomenpräparation und Lyse von Mini-Organen

Um das intrazelluläre Kompartiment zu ermitteln, in dem die Phosphorylierung des TG erfolgt, wurden Mini-Organen von Schweine-schilddrüsen präpariert und in phosphatfreiem MEM mit 1 mCi/ml $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ für 10 Min. pulsmarkiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Gewebestücke 1 Min. bei 1200 rpm und 4° C in einer Minifuge 2 (Heraeus-Christ GmbH, Osterode) sedimentiert und aliquotiert. Das Volumen der beiden Proben betrug jeweils 100 µl. Ein Aliquot wurde sogleich lysiert (s.u.), das andere mit 100 µl 0,25 M Glucose-lösung mit 10 mM EDTA und Enzyminhibitoren (siehe 2.2.6.) versetzt. Zur Gewinnung von Mikrosomen (nach Herzog und Miller 1972) wurde das Gewebe sodann mit einem Teflonpistill in einem Glas-potter 10 Min. lang auf Eis manuell homogenisiert und das Homogenat in insgesamt (einschließlich Nachspülen) 10 ml 0,25 M Sucroslösung mit Inhibitoren aufgenommen. Zur Gewinnung der postmitochondrialen Fraktion wurde diese Suspension 20 Min. bei 7° C und 10000 g zentrifugiert (Sorvall-Kühlzentrifuge RC2-B, Hormuth-Vetter, Wiesloch). Der Überstand wurde auf eine 0,34 M

Glucoselösung geschichtet und anschließend in einer Beckman Ultrazentrifuge L2 65B (Beckman Instruments, Spinco Division, Palo Alto, CA, USA) für 95 Min. bei 4°C und 125000 g zentrifugiert.

Das mikrosomale Pellet wurde - ebenso wie die Mini-Organen des anderen Aliquots - in 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, mit 0,87 % NaCl, 1% Triton X-100, 400 U/ml Trasylol, 2mM PMSF (je Probe 50 µl) 30 Min. lang bei 4 °C lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation in einer Mikrofuge (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) für 15 Min. bei 10000 g sedimentiert und das TG aus den Überständen durch Immunpräzipitation gewonnen.

2.2.5.2.) Immunpräzipitation von TG

Die Immunpräzipitation von mikrosomalem und luminalem TG aus Mini-Organen und die anschließende gelelektrophoretische Analyse wurde unter Mitarbeit von Dr. B. Holzmann (Institut für Immunologie der Universität München, z.Zt. Stanford University, CA, USA) nach der Methode von Holzmann et al. (1985) durchgeführt. Die Zellysate wurden zunächst für 5 x 3 h auf Eis mit 200 µl Sepharose CL-4B vorinkubiert, deren Oberfläche mit Proteinen aus FCS abgesättigt war, dann mit 50 µl Protein A - Sepharose CL-4B. Die eigentliche Immunpräzipitation erfolgte mit 20 µl Protein A - Sepharose CL-4B, an welche Kaninchenantikörper gegen Schweine-TG gekoppelt waren. Die sedimentierte Sepharose wurde nacheinander je 2x in folgenden Lösungen gewaschen:

- 1.) 50 mM Tris-HCl, pH 7,4
1 mM EDTA
0,5 M NaCl
0,5 % Triton X-100
- 2.) 50 mM Tris-HCl, pH 7,4
0,87 % NaCl
0,5 % Triton X-100
0,1 % SDS
- 3.) 0,87 % NaCl
0,5 % Taurocholat

Die gebundenen Immunkomplexe durch 3 Min. Kochen in reduzierendem Probenpuffer (0,15 M Tris-HCL, pH 6,8 mit 11,76 % β -Mercapto-Äthanol, 4,71 % SDS, 23,53 % Glyzerin; Laemmli, 1970) eluiert und auf ein 7,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Von den fixierten und gefärbten Gelen wurden Autoradiographien angefertigt (siehe 2.2.4.).

2.2.6.) Isolierung von TG unter phosphatfreien Bedingungen

Um gänzlich phosphatfreie Bedingungen zu schaffen, wurden - wie beim Phoshattest (siehe 2.2.8.) - alle Gefäße, die zum Ansetzen von Lösungen oder für die Isolation selbst verwendet wurden, mit einer 2-3%igen Lösung von saurem Extran (Merck, Art. 7561) vorgespült.

Zur Hemmung von während der Gewebepräparation freigesetzten

lysosomalen Enzymen und um mikrobielles Wachstum zu unterbinden, erfolgten alle Arbeitsgänge bei 4°C (Kühlung auf Eis bzw. Vor-
kühlung der Zentrifugen).

Die Schilddrüsen wurden mit acetongereinigten Rasierklingen von Binde- und Fettgewebe befreit und in Fragmente von 0,1-0,3 mm geschnitten. Diese Gewebstückchen (Feuchtgewicht ca. 10g) wurden in einem Kunststoff-erlenmeyerkolben in 70-100 ml 0,87% NaCl-Lösung suspendiert, welche mit folgenden Enzyminhibitoren versetzt war: 0,5mM PMSF, 1mM TAME, 1µg/ml Antipain, 1µg/ml Pepstatin A, 4µg/ml Aprotinin (siehe 2.1.1). Nach 2-3 h Inkubation unter mäßigem Schütteln (Laborschüttler LS 10, Gerhardt, Bonn) wurde der Überstand durch 200µm-Nylongaze (Schweizerische Seidengazefabrik, Zürich) filtriert und für 30 Min. bei 23500 g (Röhrchenboden) zentrifugiert (Sorvall-Kühlzentrifuge RC2-B oder Beckman-Ultrazentrifuge L2 65B). Das Pellet wurde verworfen, der Überstand für die weitere Präparation verwendet.

Die Methode des Ausschüttelns von Gewebefragmenten hat gegenüber der Homogenisation von Schilddrüsengewebe den Vorteil, daß die Schädigung der Zellen sehr gering ausfällt. Durch das Schütteln wird nur das luminale TG aus den angeschnittenen Follikeln gespült; Zellen, die nicht bei der Gewebepräparation beschädigt wurden, bleiben intakt.

Die weitere Isolation des TG verlief nach der Technik von Rolland und Lissitzky (1976):

Der Überstand der ersten Zentrifugation wurde mit festem Ammoniumsulfat (19,4 g auf 100 ml) auf 35 % Sättigung gebracht. Nach mindestens 2h Rühren wurde bei 10000 g für 10 Min. abzentrifugiert (Sorvall RC2-B). Der Überstand wurde mit festem Ammonium-

sulfat (5,7g auf 100 ml) auf einen Sättigungsgrad von 45 % gebracht. Nach abermals 2h Inkubation wurde erneut abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit 45 % Ammoniumsulfatlösung gewaschen und schließlich in bidestilliertem Wasser aufgenommen. Die Proteinlösung wurde unter dreimaligem Wechsel des Außendialysates etwa 30h lang gegen bidestilliertes Wasser mit ca. 0,03 % Natriumazid dialysiert, anschließend portioniert und in einem Gefriertrockner Hetosicc CD 54 (Heto, Birkeröd, DK) lyophilisiert.

2.2.7.) Enzymatische Behandlung von TG

Zur Charakterisierung seiner Phosphatgruppen wurde das isolierte TG dem Abbau mit verschiedenen Enzymen unterworfen. Ein anschließender Phosphattest (siehe 2.2.8.) erbrachte den Nachweis, ob durch das verwendete Enzym phosphorylierte Verbindungen abgespalten worden waren.

10 mg Protein wurden in 1 ml der unten angegebenen Medien, die mit etwas Natriumazid versetzt waren, gelöst und nach Zugabe der Enzyme 20h (α -Mannosidase: 22h) unter langsamen Rotieren inkubiert. Die Inkubationsbedingungen lauteten wie folgt:

1.) Endoglykosidase H:

0,1 M Citrat- oder Acetatpuffer, pH 5,5; 20 mU Endo-H; 37°C;

2.) Endoglykosidase D:

0,1 M Citrat- oder Acetatpuffer, pH 6,0; 40 mU N-Acetyl-Neuraminidase, 20 mU β -Galactosidase, 20 mU β -N-Acetyl-glucosaminidase, 20 mU Endo-D; 37°C;

Diese Enzyme bauen die komplexe Kohlenhydratseitenkette des TG in der angegebenen Reihenfolge von außen nach innen ab (Muramatsu et

al. 1978, Yamamoto et al. 1981). Zur Identifizierung des phosphorylierten Bestandteils der komplexen Kette wurden unter denselben Bedingungen Parallelabbauten durchgeführt, von denen der erste Ansatz nur Neuraminidase enthielt, der zweite Neuraminidase und β -Galaktosidase usw. (siehe 3.5.).

3.) α -Mannosidase:

10 mM Citratpuffer, pH 5,0; 3 U α -Mannosidase; 25 oder 37°C;

4.) Alkalische Phosphatase:

0,2 M Glycinpuffer mit 0,05 M $MgCl_2$, pH 8,8; 5 U Enzym; 37°C;

In einigen Fällen wurde das TG vor der Spaltung mit Alkalischer Phosphatase durch Behandlung mit 5% SDS und 50 mM β -Mercapto- β -Äthanol (2h, 37°C; anschließend Dialyse) entfaltet.

Bei den sequentiellen Abbauten mit alkalischer Phosphatase / Endoglycosidase H wurde das TG nach der Phosphatasebehandlung mit Ammoniumsulfat gefällt (siehe 2.2.6.), dialysiert und aliquotiert. Die beiden Aliquots wurden lyophilisiert und eines für die Phosphatbestimmung aufbewahrt, das andere mit Endoglycosidase H behandelt.

2.2.8.) Colorimetrische Bestimmung des Phosphatgehaltes von TG

Die Quantifizierung des Phosphatgehaltes von TG erfolgte in Anlehnung an die von Widnell (1974) beschriebene Methode. Diese mußte allerdings zunächst, etwa bezüglich der eingesetzten Mengen, auf TG anwendbar gemacht werden. Ferner mußten effektive Methoden für die Veraschung des Proteins sowie für die Hydrolyse des dabei gebildeten Pyrophosphates (s.u.) erstellt werden. Das schließlich verwendete Protokoll lautet wie folgt:

Alle verwendeten Gefäße waren mit Extran vorgereinigt (siehe 2.2.6.). Das lyophilisierte, native oder enzymatisch behandelte TG wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml (Einwaage) in bidestilliertem Wasser gelöst. Hiervon wurden pro Probe 134 oder 201 μ l (= 2 oder 3 nmol) in einem hitzebeständigen Reagenzröhrchen (12x100 mm, Nr. 26 130 11, Schott, Mainz) mit 100 μ l einer Lösung von 10 % Magnesiumnitrat in 95 % Äthanol gemischt. Ebenso wurde eine Eichreihe mit 5-20 nmol Natriumphosphat erstellt, wobei das Volumen jeweils mit bidestilliertem Wasser ergänzt wurde.

Zur Veraschung des Proteins wurden die Proben in einem mit Bohrungen versehenen Aluminiumblock auf einem Heizrührer erhitzt. Die Temperatur wurde binnen zwei Stunden stufenweise von ca. 90° auf ca. 180°C erhöht. Um die Veraschung zu vervollständigen, wurden die Röhrchen anschließend über einem Bunsenbrenner solange erhitzt, bis keine nitrosen Gase (brauner Dampf) mehr entweichen und keine verkohlten Rückstände im Glas sichtbar waren. Zur Hydrolyse des beim Veraschen gebildeten Pyrophosphates wurde der erkaltete weiße Rückstand mit 300 μ l 1N HCL versetzt und mit einem Vortex-Mischer in Suspension gebracht. Die Röhrchen wurden sodann mit vorgereinigten Glaskugeln als Verdunstungsschutz abgedeckt und für 15 Min. in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden jeweils 100 μ l 10 % Ascorbinsäure und 600 μ l Ammoniummolybdatlösung (0,42 % in 1N H₂SO₄) einpipettiert und die Proben für 20 Min. in einem Wasserbad bei 45° inkubiert. Die Messung der Extinktion von Eichwerten und TG-Proben erfolgte in einem Spektralphotometer 2400-S (Gilford Instr. Lab. Inc., Oberlin, Ohio, USA) bei 720 nm. Schließlich wurde der ermittelte

Phosphatgehalt gegen den tatsächlichen Proteingehalt der Ausgangslösung korrigiert (siehe 2.2.9.).

Der beschriebene Phosphattest wies gegenüber der Markierung von TG mit radioaktiven Phosphorisotopen u.a. folgende Vorteile auf:

- 1.) Genauere Quantifizierbarkeit als über die Bestimmung der Radioaktivität: es ließen sich Phosphatmengen von 4 nmol sicher quantifizieren.
- 2.) Verfälschungen des Ergebnisses durch Schwankungen in der Inkorporationsrate des Radioisotops bzw. durch Durchmischung von markierten und unmarkierten Proteinmolekülen waren ausgeschlossen.
- 3.) Es konnte frisch isoliertes TG ohne weitere Vorbehandlung in vitro, z.B. Radiomarkierung, verwendet werden.
- 4.) keine Ungenauigkeiten durch Radiolyse des Proteins
- 5.) Es bestanden keine Abhängigkeiten von der Zerfallsrate eines Radioisotops. Dies erleichterte die Handhabung und war vor allem bei länger dauernden sequentiellen Enzymabbauten und bei der Wiederholung von Bestimmungen von Vorteil.

2.2.9.) Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes von TG-Lösungen wurde in einer eigenen Modifikation des von Zillig (1970) beschriebenen Verfahrens durchgeführt. Dieser Test bietet u.a. den Vorteil, daß er auch auf aus Polyacrylamidgelen eluierten Proteine angewandt werden kann: Die Ergebnisse werden von Verunreinigungen durch Reste der Gelmatrix nicht beeinflußt.

Benötigte Lösungen:

1.) Entfärbegrad: Wasser : Methanol : Eisessig = 45:45:10 (v/v/v)

2.) Färbelösung: 0,24% Amidoschwarz 10B (w/v) in Entfärbelösung

Diese Lösung wurde ü.N. gerührt und anschließend durch ein Faltenfilter filtriert.

3.) Elutionsmittel: Eisessig:Ameisensäure:Wasser = 6:3:1 (v/v/v)

4.) Eichlösung: salzfreies TG, selbstisoliert, in Wasser: 2 mg/ml

Die Verwendung des gegenüber dem Verfahren von Zillig geänderten Elutionsmittel erbrachte eine bessere Löslichkeit der Celluloseacetatblättchen (s.u.) und einen verringerten Gehalt an störenden fibrillären Partikeln in der Meßküvette. Dadurch wurde die Genauigkeit des Tests erhöht.

Durchführung:

Die zu bestimmenden Proben wurden mit bidestilliertem Wasser auf eine Konzentration von 2 mg/ml (Einwaage) verdünnt. Die Eichwerte (2-10 µg) sowie die Proben wurden mit einer 10µl-Spritze (Serie 700; Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz), auf eine Celluloseacetatfolie (CA 250/0, Nr. 382025; Schleicher & Schüll KG, Dassel) aufgetragen und nach dem Trocknen in einer Kunststoffwanne 10 Min. unter leichtem Schwenken gefärbt. Der gefärbte Streifen wurde mit entionisiertem Wasser gründlich gespült und anschließend (ebenfalls unter Schwenken) ca. 20 Min. lang unter zweimaligem Wechsel des Entfärbegrades entfärbt. Nach kurzem Spülen mit entionisiertem Wasser wurde die Folie getrocknet. Die gefärbten Proteinflecken und drei Nullwerte (entfärbte Folie) wurden ausgestanzt und in je 1 ml Elutionsmittel in einem Nethelerbecher aufgelöst. Zur mechanischen Zerkleinerung der

Blättchen wurden die Probengefäße mit ihrer Spitze kurz in einen Kunststoffrotor gehalten. Die Extinktion von Standardwerten und Proben wurde bei einer Wellenlänge von 630 nm bestimmt.

2.2.10.) Enzymatischer Nachweis von M6P

2.2.10.1.) Hydrolyse des TG

Der M6P-Gehalt von TG nach Hydrolyse des Proteins wurde nach der Methode von Gawehn (1984) bestimmt.

Zunächst wurden die optimalen Hydrolysebedingungen ermittelt: Hierzu wurden jeweils 100 mg (= 150 nmol) TG in HCl oder H₂SO₄ bei 95°C (kochendes Wasserbad) hydrolysiert; das Probenvolumen, die Säurestärke und die Inkubationsdauer wurden dabei variiert. Danach wurde ein M6P-Test durchgeführt und die Effizienz der Hydrolyse anhand der Ausbeute an M6P ermittelt.

Am geeignetsten erwies sich die Hydrolyse von 150 nmol TG in 6 ml 2 N HCl für 2h. Das Hydrolysat wurde lyophilisiert - hierbei entwich ein Großteil der HCl - und in 2 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Zur Fällung verbliebener Proteinreste wurden 0.2 ml 5.8 N Perchlorsäure hinzugefügt und 10 Min. auf Eis inkubiert. Der entstandene Niederschlag wurde in einer Microfuge kurz abzentrifugiert, der Überstand mit 2,5 N NaOH neutralisiert, sterilfiltriert (Filter 030/3, 0,2 µm FP, Schleicher & Schüll, Dassel) und abermals lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 2,8 ml TEA-Puffer (siehe 2.1.1.; 50 mM TEA, 7 mM MgCl₂, 1,4 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,6) aufgenommen, sterilfiltriert und für den Test verwendet.

2.2.10.2.) Durchführung der Bestimmung

In das Reagenzglas mit der Probe wurden nacheinander

einpipettiert: - 0,10 ml NADP⁺ (11 mM)

- 0,13 ml H₂O

- 0,02 ml G6P-DH/PGI-Suspension (140 / 350 U/ml,
siehe 2.1.1.)

Für die Eichkurve wurden Ansätze hergestellt, in denen jeweils 20 µl Wasser durch verschiedene Mengen an gelöstem M6P (40, 80, 120, 160, 320 nmol) ersetzt waren.

Die Extinktion der Ansätze bei 339 nm wurde bestimmt; zum Ausschluß eventuell vorhandener Blindaktivitäten wurde die Messung nach 30 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wiederholt. Erst dann wurde die eigentliche Reaktion durch Zugabe von je 0,02 ml Phosphomannoseisomerase (600 U/ml) gestartet.

Die Reaktion der Eichwerte war nach etwa 1 h Inkubation bei RT beendet. Bedingt durch die hohen Salzkonzentrationen in den Hydrolysaten war die Umsetzung hier erst nach etwa 5 h abgeschlossen.

Als Negativkontrollen dienten Hydrolysate von Albumin oder Poly-L-Tyrosin. Die Wiederfindungsrate an M6P, ermittelt aus Parallelinkubationen von Albumin oder Poly-L-Tyrosin, denen vor der Hydrolyse bekannte Mengen an M6P (200-300 nmol) zugesetzt worden waren, betrug etwa 30%. Ferner wurden auch verfälschende Einflüsse von Mannose und Mannose-1-Phosphat auf den Test ausgeschlossen.

2.2.11.) Direkter Nachweis von M6P

Die direkte, qualitative Bestimmung von M6P erfolgte durch Auftrennung der Bestandteile von Hydrolysaten der mannosereichen Kohlenhydratseitenketten mittels Dünnschichtelektrophorese oder Dünnschichtchromatographie. Gleichzeitig dienten diese Versuche auch der Lokalisation des M6P innerhalb der Zuckerkette.

2.2.11.1.) Präparation radiophosphorylierter Zuckerketten

Zur Gewinnung von radiophosphoryliertem TG wurden Inside-out-Follikel 24h in 3 ml phosphatfreiem MEM mit 10 mCi $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ inkubiert. Die Follikel wurden in einer Minifuge sedimentiert (1 Min., 1200 rpm) und das TG aus dem Überstand mit Ammoniumsulfat gefällt. Das Präzipitat wurde dreimal mit Ammoniumsulfatlösung gewaschen, dialysiert und lyophilisiert (siehe 2.2.6.). Die mannosereichen Seitenketten wurden durch Behandlung mit Endo-H abgespalten (20 mU in 0,2 ml, siehe 2.2.7.); zur Hemmung von kontaminierenden Phosphataseaktivitäten war der Puffer mit 0,1 M Na_3PO_4 versetzt. Der Proteinanteil wurde von den freigesetzten Zuckerketten durch Fällung mit 10% TCA abgetrennt (3h, 4°C), der Überstand aliquotiert und lyophilisiert. Einige Aliquots wurden mit alkalischer Phosphatase behandelt (0,5 U in 50 μl 0,1 M Tris-HCl, pH 8.2 mit 50 mM MgCl_2 ; 24h, 37°C); die unbehandelten Proben wurden in Puffer ohne Enzymzusatz inkubiert. Anschließend wurden die Zuckerketten in 3 N HCl hydrolysiert (2h, kochendes Wasserbad), die Hydrolysate lyophilisiert.

2.2.11.2.) Analyse der M6P-haltigen Seitenketten

Die Konstituenten der Hydrolysate von enzymatisch behandelten und unbehandelten Kohlenhydratketten wurden sodann mittels Dünnschichtelektrophorese oder -chromatographie auf den Cellulosefolien F 1440 (Schleicher & Schüll, Dassel) verglichen. Dazu wurden die Proben in je 10 µl Boratpuffer, pH 10,5, gelöst. Hiervon wurden jeweils 1 µl mit 7 µl Boratpuffer und 2 µl M6P-Lösung (10 mg/ml mit 80 µl/ml Phenolrot) gemischt. Als Vergleichssubstanzen dienten (in Boratpuffer mit Phenolrot gelöst): M6P und Galaktose-6-Phosphat (20 mg/ml Endkonzentration), Phosphotyrosin (18 mg/ml), Phosphoserin (12 mg/ml), anorganisches Phosphat (als Na_2HPO_4 , 67 mM). Pro Lauf wurden jeweils 0,5 bis 2 µl aufgetragen.

Als Laufmittel für die Chromatographie diente 2 % Pikrinsäure in 80 % tert. Butanol (Benson, 1957). Die Elektrophorese wurde in 0,1 M Boratpuffer, pH 10,5, bei 0,5 kV und 1,5 A durchgeführt. Die Laufzeit der Chromatographie betrug 4 h, die der Elektrophorese 1,5 h. Die phosphorylierten Standardsubstanzen wurden mit Molybdänblau-Sprühareagenz (siehe 2.1.1) sichtbar gemacht, die radioaktiven Verbindungen mithilfe eines Röntgenfilms (Hyperfilm Betamax; Amersham Buchler GmbH, Braunschweig).

Als empfindlicher erwies sich die chromatographische Auftrennung, da sie auch Epimere von M6P, z.B. Galaktose-6-Phosphat, klar von diesem zu trennen vermochte.

Falls M6P terminal, also in Phosphomonoesterform an seine Kohlenhydratseitenkette gebunden ist, sollte dieser endständige

Phosphatrest durch alkalische Phosphatase abspaltbar sein. Die Hydrolysate der enzymatisch behandelten Zuckerketten sollten also weniger organisch gebundenes Phosphat enthalten als die der unbehandelten Ketten. Daher wurden von einer Dünnschichtplatte die Bereiche, die jeweils die partiell hydrolysierten Kohlenhydratketten und die abgespaltenen M6P-Reste enthielten, abgeschabt und ihre Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Tri-Carb 2450, Packard Instr., Frankfurt/M.) quantifiziert. Die terminale Bindung des M6P konnte durch diese vergleichende Messung bestätigt werden (siehe 3.4.2.).

2.2.12.) Bindung von ^{125}I -TG an CHO-Zellen

Diese Experimente dienten zum funktionellen Nachweis des Liganden für den M6P-Rezeptor auf dem TG-Molekül. Zu diesem Zweck wurde die Bindung von TG an die Zelloberfläche durch M6P kompetitiv gehemmt.

2.2.12.1.) Jodierung von TG

Die Radiomarkierung von TG mit ^{125}I wurde mit Hilfe von Protag- ^{125}TM als Katalysator durchgeführt. Das Verfahren folgte dem beigefügten Protokoll:

2-5 mg TG (je nach Präparation) wurden in Boratpuffer (145mM NaCl in 10 mM $\text{B}(\text{OH})_3$, pH 8,2) in einem Probengefäß aufgelöst, 0,5 mCi in 0,1 ml Puffer gelöstes ^{125}I (als NaI) hinzupipettiert und das Volumen auf 1 ml ergänzt. 200 mg Protagpulver wurden in der eiskühlten Lösung suspendiert, das Gemisch unter mehrmaligem

Schütteln 10 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurde das Katalysatorpulver in einer auf 4°C vorgekühlten Minifuge 2 sedimentiert (1 Min., 1200 rpm) und der Überstand großzügig abgenommen. Das Sediment wurde in eiskaltem Boratpuffer kurz resuspendiert, dann wieder abzentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt. Ungebundenes Jodid wurde durch zwei- bis dreimalige Ammoniumsulfatfällung (70% Sättigung) des gelösten Proteins entfernt, das Ammoniumsulfat durch Dialyse in einer Ultrafiltrationskammer (Modell 8MC, ausgestattet mit einer Diaflo-Ultrafiltrationsmembran PM-10; Amicon Corp., Danvers, MA, USA).

2.2.12.2.) Bindungsexperimente

Die CHO- (bzw. Thyreozyten-) Monolayerkulturen wurden dreimal mit auf 37°C erwärmten MEM gespült. Anschließend wurden sie für 20 Min. bei 37°C in

- MEM mit 2mM Mannose (positive Kontrollen)
- MEM mit je 2mM Mannose und Galaktose-6-Phosphat (negative Kontrollen)
- MEM mit je 2mM Mannose und M6P (Inhibierungsansatz)

vorinkubiert. Die gelöste Mannose diente zur Absättigung eventuell auf der Zelloberfläche vorhandener Mannoserezeptoren, an die TG über seine Mannoseresste hätte binden können. Dann wurden die Kulturschalen auf Eis gestellt und nach dem Abkühlen das radio-markierte TG in einer Endkonzentration von ca. 2.7 µg/ml dazupipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Kulturen zweimal mit eiskaltem MEM gewaschen und die Zellen mit

einem Gummischaber geerntet. Sie wurden in einem Nethelerbecher sedimentiert (5 Sek., Microfuge), in eiskaltem MEM aufgenommen und in neue Probenbecher überführt. Nach erneutem scharfen Abzentrifugieren wurden die Zellen bis zur Lyse eingefroren.

2.2.12.3.) Lyse der Zellen und Radioaktivitätsbestimmung

Das gefrorene Zellpellet wurde mit 100 μ l Lysepuffer (0.87% NaCl in 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, mit 1% Triton X-100, 400 U/ml Trasylol, 2mM PMSF) versetzt. Die Zellen wurden mechanisch zertrümmert, indem der Nethelerbecher mit seiner Spitze kurz in einen Kunststoffrotor gehalten wurde. Nach einer dreißigminütigen Lyse auf Eis wurden die Zelltrümmer für 15 Min. in der Microfuge pelletiert und der Überstand in neue Probengefäße übertragen. Nach erneuter zweimaliger Zentrifugation (je 5 Min. unter Wechsel des Nethelerbeckers) wurde die Radioaktivität des Überstandes in einem γ -counter (Modell Gamma 5500; Beckman Instr., Irvine, CA, USA) bestimmt. Die gemessene Radioaktivität wurde auf den Proteingehalt des Überstandes bezogen (siehe 2.2.9.).

2.2.13.) Nachweis von phosphorylierter Neuraminsäure

Zum Nachweis phosphorylierter Neuraminsäure als Bestandteil der komplexen Kohlenhydratseitenkette des TG wurde das Protein, wie unter 2.2.6. beschrieben, nach Radiomarkierung mit $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ aus dem Kulturmedium von Inside-out-Follikeln isoliert.

Das in 50 mM Acetatpuffer, pH 5,5, mit 1 mM Ca^{2+} gelöste TG wurde mit Neuraminidase behandelt (100 mU, 20 h Inkubation bei 37° C)

und von den abgespaltenen Neuraminsäureresten durch TCA-Fällung abgetrennt. Der Überstand wurde lyophilisiert und in 20 µl bidestilliertem Wasser aufgelöst.

Die Bestandteile dieser Lösung wurden auf Dünnschichtplatten F 1440 (Schleicher & Schüll, Dassel) chromatographisch aufgetrennt. Die Platten waren durch dreimaligen Vorlauf mit dem Laufmittel, einem Gemisch aus Butanol/Propanol/0,1 M HCl (1:2:1), vorgereinigt. Die Laufzeit betrug etwa 1,5 h.

Als Standard diente eine mit ^{14}C radiomarkierte, chemisch synthetisierte Probe von N-Acetyl-Neuraminsäure-9-Phosphat (1,66 kBq (= 0,045 µCi), gelöst in 300 µl Wasser; spezifische Aktivität: 12,4 MBq/mmol). Bei dieser Standardsubstanz handelt es sich um ein Geschenk von Dr. A.P. Corfield, Universität Bristol. Zunächst wurden je 1-2 µl Probe und Standardlösung verglichen. Um die geringen Unterschiede in der Wanderungsstrecke von Probe und Standard deutlich aufzulösen, wurden sodann die beiden Lösungen 1:1 gemischt und mit der Standardsubstanz verglichen. Die radioaktiven Komponenten wurden autoradiographisch sichtbar gemacht.

2.2.14.) Ausschluß von Phosphotyrosin

Die Möglichkeit, daß Phosphotyrosin ein Bestandteil des TG-Moleküls sein könnte, wurde durch alkalische Hydrolyse von radiophosphoryliertem TG nach Gelelektrophorese überprüft (Martensen 1982; Ishihara et al. 1985).

Das gefärbte und entfärbte Gel (siehe 2.2.3.) wurde für 2 h bei 55° C in 1 N KOH inkubiert. Danach wurde es bei Raumtemperatur kurz mit 1 N HCl neutralisiert.

Die nachfolgende, übliche Behandlung des Gels mit DMSO (siehe 2.2.4.) führte zu einer starken Quellung des Gels. Daher wurde es in diesem Falle zur Fluorographie 30 Min. bei Raumtemperatur in 1 M Natriumsalicylat, pH 5,6, inkubiert und anschließend direkt getrocknet (Chamberlain 1979).

2.2.15.) Einfluß von DCNP auf den Export von TG

Die Beeinflussung der Proteinsynthese und des Exportes von neusynthetisiertem TG bei Hemmung der Sulfatierung seiner Tyrosinreste wurde durch Einwirkung des Tyrosinanalogs DCNP (2,6-Dichlor-4-Nitrophenol) auf Inside-out - Follikel getestet.

2.2.15.1) Reduktion der Sulfatierung von TG

Inside-out - Follikel wurden in sulfatfreiem MEM gewaschen und in 2 Ansätze geteilt. Der eine wurde in sulfatfreiem MEM, der andere im gleichen Medium mit 50 mM DCNP vorinkubiert (15 Min., 37° C). Danach wurden beide Proben in ihrem jeweiligen Medium mit 0,2 mCi/ml $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ und 50 mU/ml TSH für 25 h bei 37° C inkubiert (siehe 2.2.1.1.).

Die Follikelsuspensionen wurden in der Minifuge 2 bei 3000 rpm und 4° C zentrifugiert, die Überstände in der Ultrafiltrationskammer auf ein Volumen von etwa je 0,7 ml eingeengt und gegen 10 mM Tris, pH 7,4 mit 20 mM KCl dialysiert.

Anschließend wurden sie gelelektrophoretisch analysiert (siehe 2.2.3.) und die (unfixierten und ungefärbten) TG-Banden ausgeschnitten. Das Protein wurde mittels Elektroelution (Elutions-

kammer 30.037, Renner GmbH, Dannstadt) in 20 mM Tris, pH 8,8, mit 153,6 mM Glycin und 0,04 % SDS extrahiert (24 h bei 15 mA), gegen bidestilliertes Wasser dialysiert und lyophilisiert. Die einzelnen TG-Proben wurden in je 1 ml Wasser gelöst und die spezifische Radioaktivität jeder Probe nach Bestimmung ihres Proteingehaltes (siehe 2.2.9.) und Messung ihrer Radioaktivität durch Flüssigkeitsszintillationszählung errechnet.

2.2.15.2.) Export von TG unter Einwirkung von DCNP

Inside-out - Follikel wurden in leucinfreiem MEM mit TSH (siehe 2.2.1.1) und 0,1 mCi/ml ^3H -Leucin, aber ohne FCS, suspendiert. Die Suspension wurde auf 3 Kulturschalen verteilt (Volumen: 4,95 ml). In die erste Schale wurden 50 μl PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) pipettiert, in die Schalen 2 und 3 je 50 μl zweier DCNP-Lösungen in PBS, pH 7,3, sodaß die Endkonzentration an DCNP 10 bzw. 50 μM betrug. Nach 24 h Inkubation wurden die Follikel pelletiert (Minifuge 2; 1 Min., 800 rpm) und die Sedimente bis zur Bestimmung ihrer jeweiligen Zellmenge anhand ihres DNA-Gehaltes (siehe 2.2.15.3.) eingefroren. Die Überstände wurden getrennt gesammelt, mittels Ultrafiltration auf jeweils 0,3 ml eingeengt und gegen 10 mM Tris, pH 7,4 mit 20 mM KCl dialysiert.

Die spezifischen Radioaktivitäten des sezernierten TG wurde durch Szintillationszählung von je 20 μl Dialysat und Proteinbestimmung (siehe 2.2.9) ermittelt. Aus diesen Werten und dem DNA-Gehalt der Zellpellets wurde die relative Exportrate in den 3 Ansätzen berechnet. Ferner wurden, um eventuelle Unterschiede in der

Sekretionsleistung direkt sichtbar zu machen, gegen die relative DNA-Menge korrigierte Volumina an TG-haltigem Dialysat gelelektrophoretisch aufgetrennt und Fluorographien angefertigt (siehe 2.2.3 und 2.2.4.).

2.2.15.3) Quantitative DNA-Bestimmung

Die Quantifizierung von DNA als Maß für die Zellmenge je Ansatz erfolgte nach der Methode von Burton (1956).

Die sedimentierten Follikel wurden mit 0,1 % wässrigem Triton X-100 (0,5 ml pro Probe) versetzt und 10 Min. bei 4° C manuell homogenisiert. Nach Zugabe von 1,5 ml Perchlorsäure wurde die Homogenate 1 h im Eisbad inkubiert und anschließend bei 5000 rpm und 4° C in der Minifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets dreimal mit eiskalter 0,5 N Perchlorsäure gewaschen und in 1,5 ml dieser Lösung resuspendiert. Die Suspension wurde 20 Min. bei 75° C in einem Wasserbad inkubiert, anschließend 5 Min. bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden für die DNA-Bestimmung verwendet.

Zur Herstellung einer Farbreagenzlösung wurden 665 mg Diphenylamin in 20 ml Eisessig gelöst, 670 µl konz. Schwefelsäure hinzugefügt und das Volumen mit Eisessig auf 25 ml ergänzt. Zu dieser Lösung wurden 170 µl einer wässrigen 1,65% Acetaldehydlösung pipettiert.

0,5 ml des Zellüberstandes wurden mit der gleichen Menge Farbreagenz gemischt. Desgleichen wurden Eichwerte mit 10 - 50 µg DNA, die ebenfalls in 0,5 N Perchlorsäure bei 75° C hydrolysiert war, hergestellt. Die Ansätze wurden 16-20 h bei Raumtemperatur

belassen, dann für je 5 Min. in der Mikrofuge und in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Die Extinktion von Proben und Eichwerten wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen einen Reagenziennullwert gemessen.

2.2.15.4) Effekt von DCNP auf die Proteinsynthese

Inside-out - Follikel wurden in 5 ml leucinfreiem MEM ohne Antibiotika, FCS und TSH (siehe 2.1.2) suspendiert und die Suspension auf 2 silikonisierte Reagenzgläser verteilt. 3 ml leucinfreies MEM, die 0,55 mCi ^3H -Leucin und 55 μl gepufferte DCNP-Lösung (50 mM, siehe 2.2.15.2.) enthielten, wurden im Wasserbad auf 37° C erwärmt und in das eine Glas einpipettiert. Der vollständige Ansatz mit einem Volumen von 5,5 ml enthielt also 0,1 mCi/ml ^3H -Leucin, das DCNP in lag in einer Endkonzentration von 50 μM vor. Der Kontrollansatz wurde mit dem gleichen Gemisch, bei dem jedoch das DCNP durch PBS ersetzt war, hergestellt. Die Proben wurden gemeinsam bei 37° C inkubiert.

Nach 5, 10, 20, 30 und 60 Min. wurde aus beiden Proben jeweils 1 ml Follikelsuspension entnommen und mit 9 ml eisgekühltem MEM verdünnt, um die Proteinsynthese abubrechen. Danach wurden die Follikel dreimal mit eiskaltem MEM gewaschen und eingefroren. Das Gesamtvolumen der Sedimente betrug jeweils ca. 0,3 ml. Auch Aliquots der letzten Waschlösung wurden zur Radioaktivitätsbestimmung aufbewahrt.

Die Follikel wurden mit 0,5 ml 0,2 % wässrigem Triton X-100 versetzt, das Volumen mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt und die Zellen in dieser Lösung 10 Min. lang bei 4° C manuell homoge-

nisiert. Die Radioaktivität von je 0,3 ml der Homogenate sowie einer entsprechenden Menge der Waschlösungen wurde durch Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt und der Wert der Waschlösungen von denen der Homogenate subtrahiert. Die entgültige Berechnung der inkorporierten Radioaktivität erfolgte durch Korrektur der obigen Werte gegen die Menge der Zellen pro Ansatz; als Maß hierfür diente der Proteingehalt der Homogenate, der nach 2.2.9. ermittelt wurde.

3.) E R G E B N I S S E

3.1.) Nachweis der Phosphorylierung von Thyreoglobulin mittels Autoradiographie

Aufgrund der im Vergleich zu ^{32}P wesentlich geringeren radioaktiven Streuung von ^{33}P fand dieses Isotop (in Form von $^{33}\text{PO}_4^{3-}$) Verwendung für den autoradiographischen Nachweis phosphorylierten Sekretionsproduktes *in situ*.

Ab einer Inkubationszeit von 5 h sah man autoradiographische Signale über dem Follikellumen der inkubierten Mini-Organen (Abb.2a). Zwar war die Silberkörnchendichte über den Follikelzellen zu allen Zeitpunkten nach Beginn der Markierung deutlich höher, was wohl auf Einbau von $^{33}\text{PO}_4^{3-}$ in RNA und andere phosphorylierte Zellbestandteile zurückzuführen ist; der Vergleich mit der source-line zeigt jedoch unzweifelhaft, daß eine Markierung des Lumens infolge radioaktiver Streuung von den Follikelzellen her praktisch auszuschließen ist: die Markierung beschränkt sich auf die Strahlungsquelle selbst (Abb.2b).

Die autoradiographische Analyse des mit $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ markierten Sekretionsproduktes von inside-out-Follikeln im SDS-Gel ergab, daß Schilddrüsenfollikelzellen von einer Vielzahl phosphorylierter zellulärer Proteine (Abb.3a) nur ein einziges sezernieren (Abb.3b); dieses konnte anhand seiner Molekülmasse und der Tatsache, daß es jodiert ist, als TG identifiziert werden (Abb.3c).

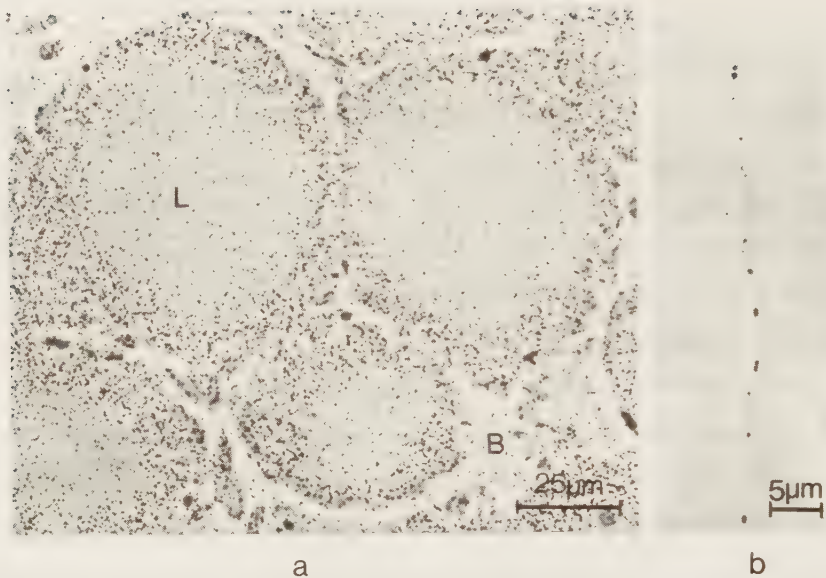


Abb.2)

Abb.2a) Lichtmikroskopische Autoradiographie ($^{33}\text{PO}_4^{3-}$) zum Nachweis von radiophosphoryliertem Sekretionsprodukt in situ:

Nach einer Markierungsdauer von 24 h sieht man in den Lumina (L) von Mini-Organen eine deutliche Anhäufung von Silberkörnchen. Während dieser Zeit ist also phosphoryliertes Sekretionsprodukt in das Lumen abgegeben worden. Die Markierung ist über den Zellen am dichtesten, das umliegende Bindegewebe (B) ist nur mäßig markiert.

Abb.2b) Die Markierung der "source-line" ist auf die Strahlungsquelle beschränkt. Silberkörner über den Lumina sind folglich nicht auf radioaktive Streuung, die von phosphorylierten Bestandteilen der Follikelzellen ausgeht, zurückzuführen.



Abb.3) Fluorographien von: a) Zellhomogenat ($^{32}\text{PO}_4^{3-}$);
 b) Sekretionsprodukt ($^{32}\text{PO}_4^{3-}$);
 c) Sekretionsprodukt (^{125}I);

Das Homogenat (a) weist eine Vielzahl markierter Banden auf. Der Anteil an autoradiographisch nachweisbarem, intrazellulären 670kD-TG ist so gering, daß unter den verwendeten Expositionsbedingungen keine entsprechende Bande sichtbar wird (vgl. b,c).

b und c) Fluorographien des aus dem Kulturüberstand von "inside-out - Follikeln" gewonnenen Sekretionsproduktes von Schilddrüsenfollikelzellen. Es ist nur eine phosphorylierte Proteinbande (b) sichtbar, die anhand der Tatsache, daß sie in ihrer Molekülmasse der einzigen radiojodierten Bande (c) entspricht, als TG anzusprechen ist.

Weitere phosphorylierte Proteinbanden im niedermolekularen Bereich, die sauren Hydrolasen entsprechen würden, sind nicht auszumachen. Der Transport lysosomaler Enzyme erfolgt in Thyreozyten also ausschließlich intrazellulär.

3.2.) Zelluläre Lokalisation der Phosphorylierung

Um den Ort der Phosphorylierung des TG innerhalb der Zelle zu bestimmen, wurden Mini-Organen 10 Minuten lang mit $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ pulsmarkiert. Anschließend wurde TG aus dem Lysat der Mikrosomenfraktion (also TG aus ER und Golgi-Komplex) und aus dem Lysat ganzer Mini-Organen (d.h. vorwiegend luminales TG) mittels Immunpräzipitation isoliert. Gleiche Mengen an TG wurden einer Gelelektrophorese unterzogen und anschließend autoradiographisch analysiert. Nur das mikrosomale TG war radiomarkiert (Abb.4); die Inkorporation des Phosphates in das TG erfolgt also im ER oder Golgi-Apparat, während extrazelluläre Phosphorylierung auszuschließen ist.

3.3.) Quantitative Analyse des Phosphatgehaltes

von nativem und enzymbehandeltem TG

Zur Quantifizierung seines Phosphatgehaltes wurde unter phosphatfreien Bedingungen isoliertes TG mit dem von Widnell (1974) ausgearbeiteten Phosphattest in einer eigenen Modifikation analysiert. Die Ergebnisse der Bestimmungen von nativem und enzymatisch behandeltem TG sind in Tabelle I zusammengefaßt:

Natives TG enthält im Durchschnitt 6 Phosphatmoleküle. Die Enzyme Endoglycosidase H, welche die mannosereiche Zuckerseitenkette abspaltet (Tarentino et al. 1973), und Endoglycosidase D, welche (nach Entfernung terminaler Zucker durch Exoglycosidasen, siehe 2.2.7.) die komplexe Kette abspaltet (Muramatsu et al. 1978), entfernen jeweils 2 Phosphatreste. Alkalische Phosphatase spaltet

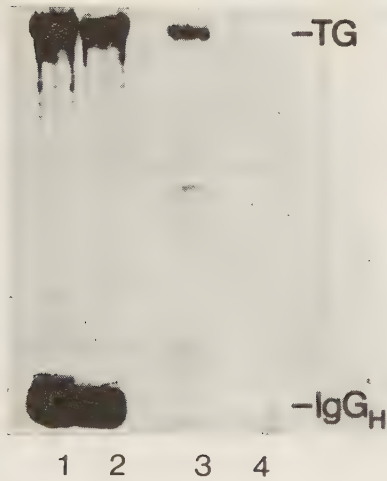


Abb.4)

SDS-Gelelektrophoretische Analyse gleicher Mengen an mikrosomalem (Spur 1 und 3) und luminalem (Spur 2 und 4) TG, das jeweils nach zehnminütiger Pulsmarkierung mit $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ aus Miniorganen gewonnen wurde. Nach diesem Zeitraum ist radiophosphoryliertes TG in der mikrosomalen Fraktion (Spur 3), nicht aber in den Lumina der Schilddrüsenfollikel (Spur 4) nachweisbar. TG wird also intrazellulär phosphoryliert.

Spur 1 und 2 zeigen die mit Coomassie-Blau angefärbten Proteinbanden zur Lokalisation des TG und zum Nachweis, daß jeweils gleiche Proteinmengen eingesetzt worden sind.

IgG_H = schwere Kette des zur Immunpräzipitation von TG verwendeten Antikörpers.

Tabelle I:

Phosphatgehalt von nativem und enzymatisch behandeltem TG

Enzym	natives, unbehandeltes TG	denaturiertes TG	n a t i v e s T G			
			Alkalische Phosphatase	Endo-H	Endo-D	Neuraminidase
Anzahl der Phosphat- gruppen + S.D.	5,92 $\pm 0,19$	2,50 $\pm 0,60$	4,08 $\pm 0,19$	4,18 $\pm 0,32$	3,98 $\pm 0,28$	3,98 $\pm 0,29$
Anzahl der Experi- mente	12	2	6	6	11	6

4 der 6 Phosphatreste des Schweine-TG konnten mit den angegebenen Enzymen abgespalten werden. Alkalische Phosphatase spaltet von nativem TG 2 Phosphatreste, nach Denaturierung des Proteins mit β -Mercaptoäthanol bis zu 2 weitere Phosphatgruppen ab. Da der phosphorylierte Bestandteil der mannosereichen Kette phosphatasesensitiv, also terminal gebunden ist (siehe 3.3.), dürfte hier Phosphomannose vorliegen. Die Angreifbarkeit durch Neuraminidase legt den Schluß nahe, daß es sich bei der phosphorylierten Verbindung der komplexen Seitenkette um ein Neuraminsäure-Ende handelt.

von nativem TG ebenfalls 2, nach Entfaltung des Proteins mittels SDS und β -Mercaptoäthanol bis zu 4 Phosphatmoleküle ab. Sequentielle Verdauung von TG mit alkalischer Phosphatase und Endoglycosidase H ergab, daß der leicht abspaltbare und deshalb offenbar auf der Oberfläche des TG-Moleküls exponierte Phosphatrest Bestandteil der mannosereichen Zuckerkette ist: Eine Behandlung mit Endoglycosidase H nach Abspaltung von 2 Phosphatresten mit alkalischer Phosphatase bewirkte keine weitere Verringerung des Phosphatgehaltes (2 unabhängige Experimente). Die Angreifbarkeit durch alkalische Phosphatase zeigt außerdem, daß dieser Phosphatrest terminal, in Phosphomonoesterform, an die mannosereiche Kohlenhydratseitenkette gebunden ist.

3.4.) Nachweis von Mannose-6-Phosphat

3.4.1.) Enzymatische Bestimmung von Mannose-6-Phosphat

Der Nachweis terminal gebundenen Phosphates an der mannosereichen Zuckerkette machte das Vorliegen phosphorylierter Mannose wahrscheinlich. Gestützt wurde diese Vermutung durch die Abspaltbarkeit zweier Phosphatreste durch α -Mannosidase: nach Behandlung mit diesem Enzym enthielt TG nur noch 3.85 ± 0.15 Phosphatgruppen (2 unabhängige Bestimmungen). Dieses Ergebnis stellt allerdings noch keinen sicheren Nachweis von Mannosephosphat dar, da kommerziell erhältliche α -Mannosidasepräparationen mit Phosphatasen verunreinigt sein können. Außerdem erlaubt es keine Aussagen darüber, um welches Phosphomannoseisomer es sich handelt. Daher wurden lyophilisierte HCl-Hydrolysate von TG mit einem hochspezifischen enzymatischen Test (Gawehn 1984) auf das Vor-

liegen von Mannose-6-Phosphat (M6P) überprüft. Wie Tabelle II zeigt, enthält ein Molekül TG tatsächlich 0.6 Moleküle M6P. Durch Korrektur gegen die aus den Kontrollen ermittelte Wiederfindungsrate von M6P, die etwa 30% beträgt, errechnet sich hieraus ein tatsächlicher M6P-Gehalt von etwa 2.2 Molekülen M6P, was mit dem Erwartungswert (2 Moleküle M6P) sehr gut übereinstimmt.

3.4.2.) Nachweis von radiomarkiertem Mannose-6-Phosphat

Der direkte Nachweis von M6P in Monoesterbindung erfolgte nach Abspaltung der mannosereichen Zuckerketten von biosynthetisch radiophosphoryliertem TG durch Endoglykosidase H.

Die Auftrennung von Hydrolysaten solcher Zuckerketten mittels Dünnschichtchromatographie oder -elektrophorese lieferte einen autoradiographischen Fleck in Höhe des unmarkierten M6P-Standards. Behandlung der mannosereichen Ketten mit alkalischer Phosphatase vor ihrer Hydrolyse resultierte in einer Abnahme der Intensität dieses Flecks (Abb.5).

Die vergleichende Messung der Radioaktivität nach Abschaben der entsprechenden Bereiche von der Dünnschichtplatte ergab, daß Phosphatasebehandlung die mit M6P assoziierte Radioaktivität (und die der partiell hydrolysierten Zuckerkette) um etwa 47% reduzierte. Die Effizienz der Phosphataseverdauung ist nicht bekannt; es läßt sich daher nur die Feststellung treffen, daß zumindest die Hälfte der M6P-Moleküle durch Phosphatase abspaltbar und somit als Phosphomonoester gebunden sind.

T a b e l l e II:

Enzymatischer Nachweis von M6P

mol M6P pro mol TG (nachgewiesen)	Wiederfindungs- rate (%) + S.D.	tatsächlicher M6P-Gehalt von TG (berechnet)
$0,6 \pm 0,3$ $n = 8$	$28,6 \pm 6,8$ $n = 4$	$2,2$

Säurehydrolysate von TG wurden auf ihren M6P-Gehalt untersucht.

Als positive Kontrollen zur Bestimmung der Wiederfindungsrate diente Albumin oder Poly-L-Tyrosin, welchem vor der Hydrolyse bekannte Mengen an M6P zugesetzt worden waren.

Der tatsächliche M6P-Gehalt von TG wurde durch Korrektur des gefundenen M6P-Gehaltes gegen die Wiederfindungsrate ermittelt.

(S.D. = Standardabweichung)

MANNOSEREICHE ZUCKERKETTE

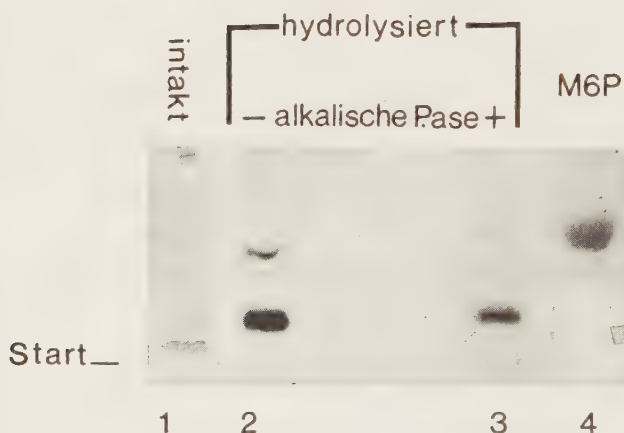


Abb.5)

Dünnschichtchromatographischer Nachweis von M6P als Bestandteil der Mannosereichen Zuckerseitenkette von TG:

Spur 1 zeigt, daß die mannosereiche Seitenkette des Schweine-TG phosphoryliert ist. Saure Hydrolyse dieser Kette erbringt die Abspaltung eines Teils der gebundenen M6P-Moleküle (Spur 2 und 3, oben). Der untere Fleck in Spur 2 (und 3) stellt die partiell hydrolysierte Zuckerseitenkette dar. Die Behandlung der Kohlenhydratkette mit alkalischer Phosphatase vor ihrer Hydrolyse (Spur 3) hat eine Abnahme der Intensität des autoradiographischen Flecks, sowohl beim freigesetzten M6P als auch bei der teilweise hydrolysierten Oligosaccharidkette, zur Folge. Dies beweist, daß zumindest ein Teil des M6P in terminaler Bindung vorliegt. Spur 4 zeigt den mit Molybdänblau gefärbten M6P-Standard.

3.4.3.) Bindung von Thyreoglobulin an CHO-Zellen

Der Nachweis von terminal gebundenem M6P legte den Schluß nahe, daß TG, obgleich es ein obligatorisch sekretorisches Protein ist, das lysosomale Transportsignal trägt. Dieser strukturelle Befund mußte allerdings auch in funktioneller Hinsicht abgesichert werden. Dazu wurde die Bindung von in vitro radiojodiertem TG an CHO-(Chinese Hamster Ovary)-Zellen, die den M6P-Rezeptor an ihrer Oberfläche exprimieren, getestet.

Bei 4° C adsorbiert radiomarkiertes TG an CHO-Zellen. Diese Bindung wird, zumindest teilweise, durch M6P vermittelt, da sie durch Zugabe von gelöstem M6P (2mM) zum Kulturmedium - nicht durch andere phosphorylierte Zucker, wie Galaktose-6-Phosphat - inhibiert werden kann: im Vergleich zur Kontrolle betrug die Bindung in Anwesenheit von M6P nur noch $53,8 \pm 18,3 \%$ (7 unabhängige Bestimmungen), in Gegenwart von Galaktose-6-Phosphat jedoch $104,3 \pm 14,0 \%$ (5 unabhängige Experimente). Den gleichen Effekt übt M6P auch auf die Bindung von TG an Schilddrüsenzellen aus: die Hemmung belief sich hier auf $41,3 \pm 3,0 \%$ (2 unabhängige Experimente). In beiden Fällen ist eine Bindung über einen eventuell vorhandenen Mannoserezeptor auszuschließen, da alle Experimente, einschließlich der Kontrollen, in Anwesenheit von 2mM Mannose durchgeführt wurden.

3.5.) Nachweis phosphorylierter Neuraminsäure

Tabelle I zeigt, daß auch Endoglykosidase D einen Phosphatrest pro TG-Untereinheit abzuspalten vermag. Der Aufbau der komplexen Kette des TG ist bekannt (Yamamoto et al., 1981). Um die Natur dieses zweiten Zuckerphosphates zu ermitteln, wurden Parallelinkubationen von TG durchgeführt, bei denen die terminalen Zucker der komplexen Kette durch Exoglykosidasen stufenweise abgedaut wurden. Anschließend wurde der Phosphatgehalt der einzelnen Ansätze bestimmt.

Es stellte sich heraus, daß bereits im ersten Ansatz, der nur Neuraminidase enthielt, 2 Phosphatreste entfernt wurden, was auf das Vorliegen phosphorylierter Neuraminsäure hindeutet (siehe Tabelle I). Dieses Resultat ist insofern interessant, als phosphorylierte Neuraminsäurederivate bisher nur als Zwischenprodukt der Neuraminsäure-Biosynthese angesehen werden, niemals aber in reifen Kohlenhydratketten nachgewiesen worden sind (Schauer 1985).

Für den direkten Nachweis dieser Verbindung wurde mit $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ -biosynthetisch radiomarkiertes TG mit Neuraminidase behandelt und der abgespaltene Zucker dünnschichtchromatographisch mit dem von Dr. A.P. Corfield (Universität Bristol) dankenswerterweise zur Verfügung gestellten, chemisch synthetisierten Standard aus (^{14}C)-N-Acetyl-Neuraminsäure-9-Phosphat verglichen.

Es zeigte sich, daß die beiden autoradiographisch nachweisbaren Banden sich etwa in gleicher Höhe befanden. Bei genauerem Vergleich, nämlich bei der Auftrennung eines Gemisches von Probe und Standard, stellte sich jedoch heraus, daß die Probe geringfügig

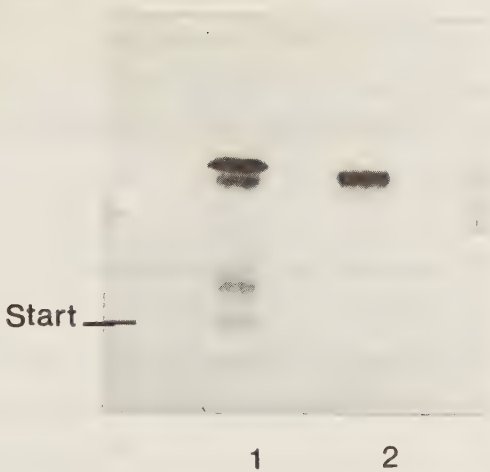


Abb.6)

Dünnschichtchromatographische Analyse des radiophosphorylierten Spaltproduktes nach Behandlung von TG mit Neuraminidase:

Der Vergleich eines Gemisches aus dem Spaltprodukt und der ^{14}C -markierten Standardsubstanz N-Acetylneuraminsäure-9-Phosphat (Spur 1) mit dieser in reiner Form (Spur 2) zeigt, daß die beiden Substanzen nicht völlig identisch sind.

schneller lief als die Standardsubstanz (Abb.6).

Die beiden Substanzen sind also nicht identisch; bei der entdeckten Verbindung dürfte es sich entweder um ein anderes Isomer von N-Acetyl-Neuraminsäurephosphat oder aber um ein anderes Derivat phosphorylierter Neuraminsäure, etwa N-Glycolyl-Neuraminsäurephosphat handeln.

3.6.) Ausschluß von Tyrosinphosphat

Zwei Phosphatreste pro dimerem TG waren der Behandlung mit verschiedenen Exo- und Endoglykosidasen gegenüber resistent; außerdem ließen sie sich auch durch alkalische Phosphatase nicht abspalten (Tab. I). Da Phosphatester von Aminosäuren schlechte Substrate für Phosphatasen sind, ergab sich die Schlußfolgerung, daß diese beiden Moleküle möglicherweise als Phosphoaminosäuren vorliegen.

Martensen (1982) hat gezeigt, daß Phosphotyrosin die alkali-stabilste Phosphoaminosäure ist und daß bei Einwirkung von 1 M KOH auf Proteine (für 2 Std. bei 55° C) alle anderen Phosphat-ester hydrolysiert werden.

Ein Polyacrylamidgel mit biosynthetisch radiomarkiertem TG verlor durch diese Behandlung alle Radioaktivität (nicht gezeigt). Phosphotyrosin ist also kein Bestandteil von normalem Schweine-TG.

3.7.) Export von TG bei gehemmter Synthese von Tyrosinsulfat

Hille et al. (1984) brachten die Hypothese vor, daß Tyrosinsulfat (Tyr-SO₄), nachdem es Bestandteil einer ganzen Reihe exportabler Proteine ist, die Funktion eines Exportsignals haben könnte. Um diese Vermutung für TG zu überprüfen, wurde die Bildung von Tyr-SO₄ durch Dichlornitrophenol (DCNP) als kompetitivem Inhibitor gehemmt.

Zusatz von 10 bzw. 50 µM DCNP in das Kulturmedium von inside-out Follikeln hatte eine Reduktion des Sulfatgehaltes des sezernierten TG um etwa 73 % zur Folge (Tab. III). Bei einem durchschnittlichen Sulfatgehalt von etwa 12 Residuen pro TG-Molekül (Herzog 1985b) bedeutet dies, daß die Anzahl der an das Protein gebundenen Sulfatreste auf 3 reduziert wurde (Tab. III).

Die Einwirkung einer gepufferten DCNP-Lösung auf inside-out - Follikel hat keinen Einfluß auf ihre Proteinsyntheseleistung (Abb.7). Eine eventuelle Beeinträchtigung der Exportrate von TG kann also nicht auf einen solchen Effekt zurückgeführt werden. Wie sich aber herausstellte, ist die Menge des exportierten TG bei Blockierung der Tyrosinsulfatierung nicht verringert (Abb.8). Die Sulfatierung von Tyrosin stellt also keine Voraussetzung für einen normalen Export von TG dar.

T a b e l l e III:

Hemmung der Sulfatierung von TG durch DCNP

	dpm pro mg TG	inkorporiertes $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ (%)	mol SO_4^{2-} - pro mol TG
- DCNP	114×10^6	100	12
+ DCNP (50 μM)	31×10^6	27	3

Die Anwesenheit von 50 μM DCNP im Kulturmedium erbrachte eine Hemmung der Sulfatierung des sezernierten TG um ca. 73 %, d.h. der Sulfatgehalt war von 12 (Herzog 1985b) auf 3 SO_4^{2-} -Reste herabgesetzt.

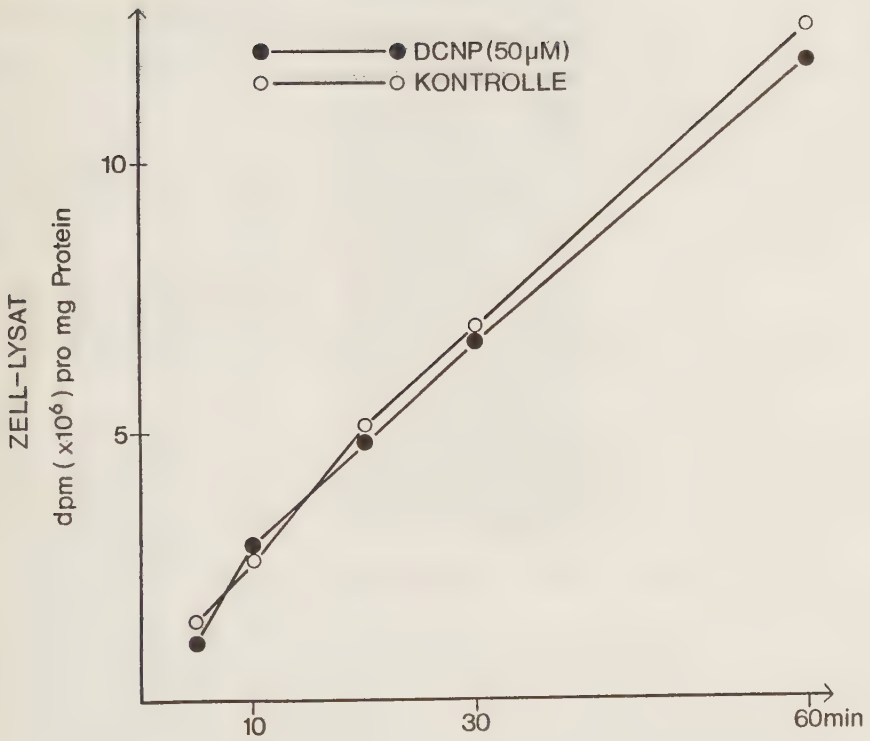


Abb.7)

Ausschluß der Beeinträchtigung der Proteinsynthese durch DCNP:
 Der Zusatz von 50 μM DCNP zum Kulturmedium von inside-out -
 Follikel hatte keinen Einfluß auf die Inkorporation von ^3H -
 Leucin. Dies zeigt, daß gepuffertes DCNP die Proteinsynthese
 nicht hemmt.

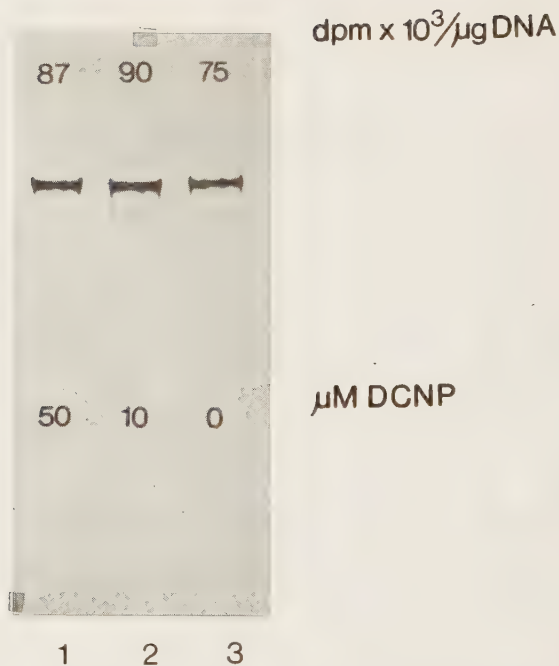


Abb.8)

Gelelektrophoretische Analyse von sezerniertem TG in Gegenwart von 50 μM (Spur 1) bzw. 10 μM DCNP (Spur 2) sowie in Abwesenheit von DCNP (Spur 3). Die Zahlen am oberen Bildrand geben die gegen die jeweilige Zellmenge korrigierten Ergebnisse der Radioaktivitätsmessung an. Aufgetragen wurden gleiche Mengen an TG-haltigem Kulturüberstand nach Ultrafiltration.

Trotz Hemmung der Tyrosinsulfatierung (vgl. Tab.III) bewirkt der Zusatz von bis zu 50 μM DCNP zum Kulturmedium von inside-out - Follikeln keine Herabsetzung der Sekretionsleistung der Thyreozyten.

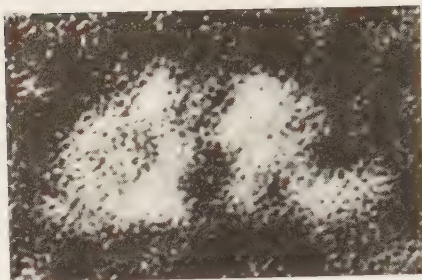
4.) D I S K U S S I O N

Mehrere posttranslationale Modifikationen des TG sind bisher bekannt: Glykosylierung (Spiro und Spiro 1966, Tsuji et al. 1981, Yamamoto et al. 1981), Jodierung (Ekholm und Wollman 1975) und Sulfatierung (Herzog 1985a und b). Die vorliegende Untersuchung beschreibt eine weitere Modifikation, die Phosphorylierung (vgl. Abb.9).

4.1) Zur intrazellulären Lokalisation der Phosphorylierung

Lichtmikroskopische Autoradiographien zeigen die Akkumulation von radiophosphoryliertem Sekretionsprodukt in den Lumina der Schilddrüsenfollikel. Bedingt durch die dominierende Inkorporation von $^{33}\text{PO}_4^{3-}$ in verschiedene Konstituenten des Cytoplasmas, vornehmlich wohl RNA, erlauben sie jedoch keinerlei Rückschlüsse auf das intrazelluläre Kompartiment, in dem die Phosphorylierung des TG erfolgt. Die Immunpräzipitation von mikrosomalem TG, das aus inside-out - Follikeln nach Pulsmarkierung mit $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ gewonnen worden war, zeigte jedoch, daß die Phosphorylierung von TG ein intrazellulärer Vorgang ist, welcher zumindest teilweise im ER oder im Golgi-Komplex stattfindet. Da andererseits luminales TG bei dieser Pulsmarkierung unmarkiert blieb, läßt sich eine extrazelluläre Phosphorylierung, wie sie von Brandley und Schnaar (1985) für die Prozessierung an der Zelloberfläche gelegener Zuckerketten beschrieben worden ist, ausschließen.

a



b

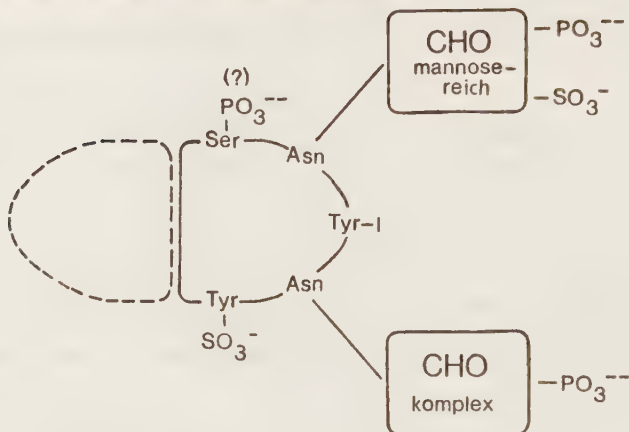


Abb.9)

Elektronenmikroskopische Aufnahme (a) und schematisches Modell (b) des TG-Moleküls:

Man erkennt deutlich die beiden Untereinheiten des ovoiden Moleküls. Seine Breite beträgt ca. 30 nm, seine Höhe ca. 15 nm.

(Aufnahme: V. Herzog, München; mit freundlicher Genehmigung)

Das Schema zeigt die wichtigsten posttranslationalen Modifikationen des TG-Moleküls: Es trägt mannosereiche und komplexe Kohlenhydratseitenketten. Die mannosereiche Kette ist sowohl sulfatiert als auch phosphoryliert; das Phosphat liegt hierbei als M6P vor, auch das Sulfat ist an Mannose gebunden. Die komplexe Seitenkette ist nicht sulfatiert. Eines ihrer Neuraminsäuremoleküle ist jedoch phosphoryliert. Der größte Teil des Sulfatgehaltes von TG liegt in Form von Tyrosinsulfat vor. Andere Tyrosinreste sind jodiert. Diese beiden Modifikationen schließen einander aus. Auch ein Teil des Phosphates ist an Aminosäuren gebunden, wahrscheinlich an Serinreste.

4.2.) Quantifizierung und Lokalisation der Phosphatreste des TG-Moleküls

Die Quantifizierung des Phosphatgehaltes von TG wurde mithilfe des von Widnell (1974) beschriebenen, höchst empfindlichen Phosphattests durchgeführt; dieses Verfahren war vorher so modifiziert worden, daß es sich auf TG anwenden ließ.

Zunächst wurde damit gezeigt, daß TG im Durchschnitt 6 Phosphatmoleküle trägt (siehe Tab. I). Da TG ein Glykoprotein mit hohem Kohlenhydratanteil (10%, Gottschalk und Ada 1956) ist, bestand die Möglichkeit, daß zumindest ein Teil des Phosphates an Zuckerseitenketten gebunden ist. Tatsächlich zeigte die enzymatische Abspaltung der mannosereichen Kette mit Endoglykosidase H (Tarentino et al. 1974, Muramatsu et al. 1976), bzw. der komplexen Kette mit Endoglykosidase D (Muramatsu et al. 1978), daß jede der beiden Seitenkettentypen pro TG-Untereinheit einen Phosphatrest trägt. Die Phosphatgruppen zumindest der mannose-reichen Zuckerkette sind durch alkalische Phosphatase angreifbar. Daraus folgt, daß sie in Phosphomonoesterform gebunden sind.

Die Lokalisation der verbleibenden zwei Phosphatmoleküle pro TG-Molekül ist bisher ungeklärt: Sie sind nicht angreifbar durch die verschiedenen verwendeten Exo- und Endoglykosidasen; dies macht die Bindung an Aminosäuren wahrscheinlich. Andererseits entfernte eine alkalische Behandlung des TG alle vorhandenen Phosphatreste, sodaß das Vorliegen von Tyrosinphosphat auszuschließen ist. Spiro und Gorski (1986) wiesen im TG verschiedener Spezies Phosphoserin nach; dieser Befund wurde unterdessen von Consiglio et al. (1987) bestätigt. Es ist also sehr wahrschein-

lich, daß auch das TG des Schweines Phosphoserin enthält.

4.3.) Mögliche Funktionen des Phosphates

4.3.1) Strukturbestimmende Funktionen

Die Phosphatgruppen tragen - ebenso wie Sialinsäuren, Sulfatreste und negativ geladene Aminosäurereste - zum anionischen Charakter des TG bei. Der hohe Kompaktierungsgrad des in den Follikellumina gespeicherten TG, seine Konzentration dort beträgt 100-400 mg/ml (Smeds 1972), wird wahrscheinlich durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen solchen anionischen Gruppierungen und Ca^{2+} -Ionen ermöglicht (Haeberli et al. 1978; Herzog 1985a und b).

Vor allem an Aminosäurereste gebundene Phosphatgruppen können, da sie in Esterbindung immer noch mehrere negative Ladungen tragen, durch Interaktion mit den, zumeist ebenfalls geladenen, Aminosäureresten in ihrer Umgebung bestimmte Konformationen des Proteins stabilisieren bzw. überhaupt erst ermöglichen. Diese strukturbestimmende Funktion erfüllt Phosphat äußerst zuverlässig; seine Ester sind nämlich gegen Spaltung durch nukleophile Agentien, wie etwa Wasser, wesentlich resistenter als die von Sulfat oder anderen in Zellen häufig vorkommender, mehrbasiger Säuren und deshalb in wässrigem Milieu sehr stabil (Westheimer, 1987). Diese Stabilität ist auch die Ursache für die hier behandelte Verwendung phosphorylierter Kohlenhydrate als Transportsignal. Da andererseits die enzymatische Esterhydrolyse sehr schnell und zuverlässig verläuft, stellt das Phosphatmolekül auch ein ideales Schaltmolekül dar. Aus diesem Grunde findet die Phosphorylie-

rungsreaktion in der Zelle bei einer ganzen Reihe empfindlicher und schnell reversibler Regulationsvorgänge Anwendung. Beispiele hierfür sind (Greengard 1978): die Aktivierung bzw. Inaktivierung von Enzymen, die Regulation der Syntheserate von "second messenger"-Molekülen zur Vermittlung der Wirkung von Peptidhormonen sowie die Hemmung der Proteinsynthese, etwa durch Interferon.

4.3.2.) Mögliche Transportfunktionen

TG vereint in sich Charakteristika von exportablen und lysosomalen Proteinen. Die Freisetzung der Schilddrüsenhormone erfolgt unter Proteolyse des TG-Moleküls in den Lysosomen. TG und saure Hydrolasen haben also einen gemeinsamen Bestimmungsort, den sie allerdings auf völlig getrennten Wegen erreichen:

In Thyreozyten werden neusynthetisierte lysosomale Enzyme direkt, auf intrazellulärem Wege zu Lysosomen transportiert; sie erscheinen demzufolge auch nicht als sekretorische Komponente im Follikellumen (bzw. bei inside-out-Follikeln im Kulturmedium, siehe Abb.3). TG dagegen erreicht die Lysosomen ausschließlich nach Sekretion, extrazellulärer Speicherung und Wiederaufnahme in die Zelle (Wollman 1969). Der Export ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Produktion von Schilddrüsenhormonen, da die Jodierung der Tyrosylreste des TG an der apikalen Membran der Schilddrüsenfollikelzellen erfolgt (Ekholm und Wollman 1975). Es erhob sich daher die Frage nach den Signalen, die diesen komplexen, hochregulierten Transportweg des TG bestimmen.

4.3.2.1.) Das lysosomale M6P-Signal

TG stellt den bisher einzigen bekannten Fall dar, in dem ein Protein, das das lysosomale Erkennungssignal M6P trägt, unter normalen, physiologischen Bedingungen obligatorisch exportiert wird (Neumüller und Herzog 1985, 1986; Herzog et al. 1987). Der Nachweis dieses Signals geschah auf dreierlei Weise:

- 1.) indirekt durch ein hochspezifisches enzymatisches Nachweisverfahren für M6P;
- 2.) durch direkte Sichtbarmachung des M6P eines Hydrolysates der mannosereichen Zuckerseitenkette nach Radiophosphorylierung;
- 3.) Die funktionelle Bestätigung, daß das M6P eine Konfiguration einnimmt, die einen Liganden für den M6P-Rezeptor darstellt, wurde durch die M6P-Abhängigkeit der Bindung von TG an CHO-Zellen erbracht.

Yamamoto et al. (1984, 1985) wiesen in TG aus Schilddrüsentumoren M6P in Diesterbindung, d.h. durch N-Acetylglucosamin maskiert, nach. Diese M6P-Moleküle kamen sowohl in mannosereichen als auch in komplexen Seitenketten und Hybridformen zwischen diesen beiden Typen vor. Spiro und Gorski (1986) identifizierten Serinphosphat als Bestandteil von TG aus normalem Schilddrüsen Gewebe; der enzymatische Nachweis von M6P oder anderen Zuckerphosphaten gelang ihnen nicht. Mittlerweile haben Consiglio et al. (1987) das Vorkommen von Zucker-6-Phosphaten in den mannosereichen Kohlenhydratseitenketten des normalen TG, u.a. durch NMR-Spektroskopie, bestätigt.

Sahagian und Gottesman (1982) beschrieben in transformierten Mäusefibroblasten ein weiteres M6P-tragendes, sekretorisches

Protein, das sog. MEP (major exportable protein). Die immunzytochemische Lokalisation wies MEP in nichttransformierten Zellen allerdings als lysosomales Protein aus. Weiterhin zeigten Gottesman und Sobel (1980), daß eine Behandlung kultivierter Fibroblasten mit transformierenden Agentien eine stark erhöhte Syntheserate von MEP zur Folge hat, sodaß die Sekretion dieses Proteins durch transformierte Zellen vermutlich auf eine Überschußproduktion zurückzuführen ist.

Schilddrüsenfollikelzellen exprimieren an ihrer apikalen Oberfläche den M6P-Rezeptor (Scheel und Herzog 1987); diese Beobachtung wurde funktionell bestätigt durch die Inhibierbarkeit der Bindung von TG an Thyreozytenmonolayer in Gegenwart von freiem M6P. TG wiederum trägt ein funktionsfähiges lysosomales Transportsignal. Dies legt den Schluß nahe, daß dieses Signal für den Transport des TG zu Lysosomen nach Wiederaufnahme aus dem Follikellumen verantwortlich ist.

Da die Endozytose des gespeicherten TG durch TSH reguliert ist, also offensichtlich nicht allein von der Bindung des TG an den M6P-Rezeptor induziert wird, ist möglicherweise ein weiteres Signal für eine effektive Aufnahme zu postulieren; über dessen Natur ist allerdings bisher nichts bekannt.

Unklar bleibt ferner der Mechanismus des Exportes von TG. TG wird in seiner Gesamtheit exportiert; der direkte Transport eines geringen Anteils von autoradiographisch nachweisbarem, neusynthetisierten Thyreoglobulin zu Lysosomen ist ausgeschlossen worden (Wollman 1969).

Die funktionell effektivste Ligandenstruktur des lysosomalen Markers besteht aus 2 M6P-Resten, in bestimmter Konfiguration an

eine mannosereiche Kohlenhydratseitenkette gebunden. Sie liegt normalerweise, allerdings nicht ausschließlich, bei der Mehrzahl der lysosomalen Enzymmoleküle vor (Natowicz et al. 1983). TG dagegen trägt im Durchschnitt nur 2 M6P-Reste. Dies impliziert, daß jede der (als identisch geltenden) beiden Untereinheiten nur 1 solches Molekül gebunden hat. Die Bindung einer einfach phosphorylierten mannosereichen Zuckerseitenkette an den M6P-Rezeptor ist jedoch etwa zehnmal schwächer als die des effektivsten Liganden (Natowicz et al. 1983). Dies könnte eine Möglichkeit zur Verhinderung eines direkten, intrazellulären Transportes von TG zu Lysosomen sein: Ein Großteil des neusynthetisierten TG würde im Golgi-Komplex aufgrund seiner geringen Affinität gar nicht erst an den M6P-Rezeptor binden. Für die Wiederaufnahme aus dem Lumen wäre die reduzierte Bindungsfähigkeit unerheblich, da TG das einzige, überdies in sehr hoher Konzentration gespeicherte, luminale Protein ist.

Allerdings kann dieser Mechanismus nicht den völligen Ausschluß des lysosomalen Transportweges für TG erklären. Auch eine Maskierung des M6P-Signals im Golgi-Komplex, etwa durch eine hier vorliegende andere Konformation des Proteinmoleküls, ist sehr unwahrscheinlich: die Bedingungen im Golgi-Komplex und im Follikellumen sind, beispielsweise bezüglich des (in beiden Fällen leicht sauren) pH-Wertes sehr ähnlich, sodaß eine drastische und stabile Konformationsänderung ausgeschlossen werden kann. Obendrein müssen die zu phosphorylierenden Zuckerseitenketten den beteiligten Enzymen zugänglich und deshalb auch in den Golgi-Zysternen exponiert sein.

Eine Maskierung des M6P-Signals durch einen terminal gebundenen

Zucker, der während des Exports wieder abgespalten wird, ist ebenfalls nicht ausreichend, weil auch diese Struktur - wenn auch mit nochmals verringerter Affinität - an den M6P-Rezeptor zu binden vermag (Creek und Sly 1982; Gabel et al. 1982).

Es ist dehalb sehr wahrscheinlich, daß das TG-Molekül außer dem lysosomalen M6P-Marker ein weiteres, bisher unidentifiziertes, Exportsignal trägt, welches über die M6P-Gruppierung dominiert und so den direkten Transport des TG zu Lysosomen verhindert (ES in Abb.10). Nur eine solche Hierarchie der Signalstrukturen liefert eine befriedigende Erklärung für den völligen Ausschluß des Transportes von TG zu Lysosomen unmittelbar nach seiner Fertigstellung.

4.3.2.2.) Mögliche Signalfunktion der Phosphoneuraminsäure

Die Funktion der phosphorylierten Neuraminsäure des TG ist bisher unbekannt. Es existieren allerdings Hinweise, wonach sie das postulierte Exportsignal sein könnte:

- 1.) Die Einwirkung von Tunicamycin, einem Hemmstoff, welcher die N-Glykosylierung von Proteinen unterbindet, resultiert in einer Hemmung des Exportes von TG (Bauer und Herzog, unveröffentlicht).
- 2.) Monaco und Robins (1973) beschrieben eine Sialyltransferase-defekte Schilddrüsentumorzelllinie, die ebenfalls einen Exportdefekt für TG aufweist. ("Sialinsäuren" ist ein Sammelbegriff für Derivate der Neuraminsäure; unsubstituierte Neuraminsäure kommt in der Natur nicht vor (Schauer 1985).)

Abb.10)

Posttranslationale Modifikationen und zellulärer Transport von Schweine-TG (Zusammenfassung):

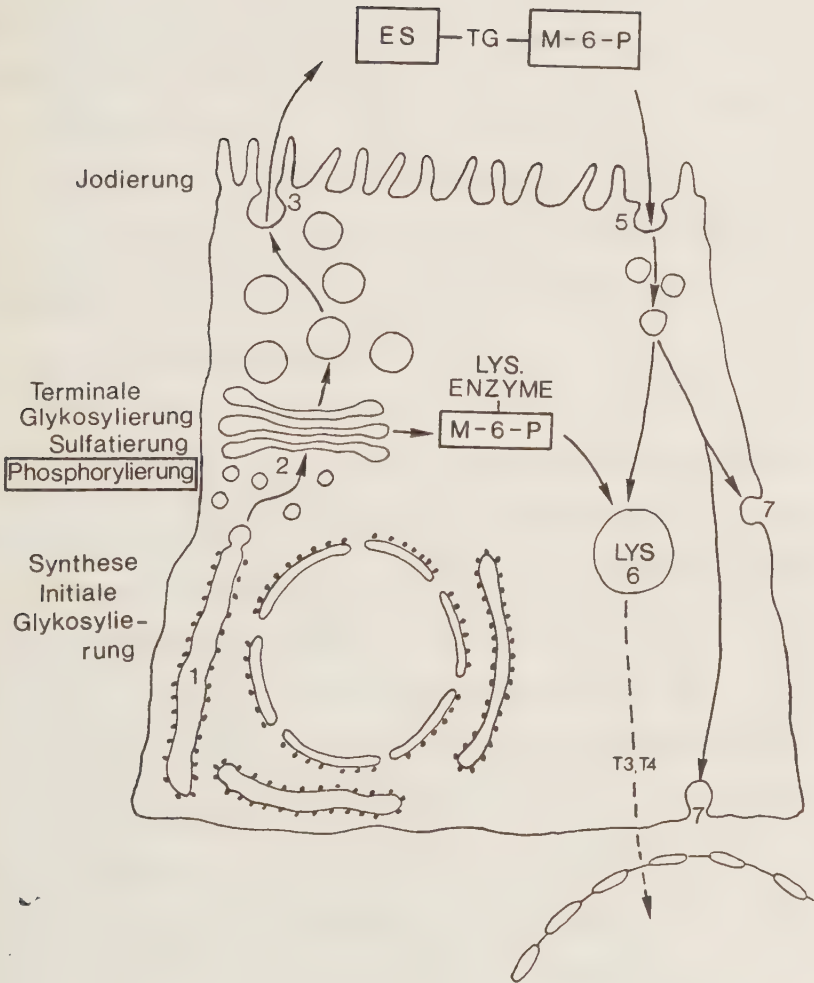
Neusynthetisiertes TG wird in das ER-Lumen (1) abgegeben, wo das Signalpeptid abgespalten wird und die Glykosylierung beginnt. Durch vesikulären Transport gelangt das TG zum Golgi-Apparat (2), wo terminale Glykosylierung und Sulfatierung erfolgen. Die Phosphorylierung findet ebenfalls im Golgi-Komplex, zum Teil vielleicht auch schon im ER statt.

Vom Golgi-Apparat wird das TG zur apikalen Zellmembran transportiert, wo nach seiner Exocytose (3) als letzte und für die Hormonbildung entscheidende Modifikation des Moleküls die Jodierung von Tyrosylresten erfolgt.

Trotz des Vorliegens von M6P als lysosomalem Transportsignal ist der direkte, intrazelluläre Transport von TG zu Lysosomen, der in Thyreozyten den einzigen Weg für neusynthetisierte lysosomale Enzyme darstellt (vgl. Abb.3) ausgeschlossen worden. Die hier erarbeiteten Befunde deuten darauf hin, daß ein noch nicht näher charakterisiertes, übergeordnetes Exportsignal (ES) für die strikte Einhaltung der Exportroute verantwortlich ist.

Das in den Follikellumina (4) gespeicherte TG wird in regulierter Weise endozytiert (5) und in Lysosomen (LYS) abgebaut (6). Die während der Proteolyse freigesetzten Schilddrüsenhormone werden auf ungeklärte Weise in die Blutbahn abgegeben. Der lysosomale Transport des TG wird vermutlich, zumindest teilweise, durch seine M6P-Gruppierung vermittelt. Ein Teil des endozytierten TG entgeht dem lysosomalen Abbau durch Transzytose (7).

4



Die Neuraminsäuremoleküle der komplexen Zuckerseitenkette könnte also sehr wohl den wesentlichen Bestandteil einer Signalstruktur der Exportroute von TG bilden. Nicht geklärt ist allerdings bisher die Frage, ob das gesuchte Transportsignal tatsächlich von der Phosphoneuraminsäure oder von anderen Neuraminsäureresten des TG-Moleküls gebildet wird. Nachdem phosphorylierte Neuraminsäure einen Sonderfall darzustellen scheint, bleibt außerdem völlig offen, ob bei anderen Proteinen bzw. in anderen Zelltypen weiteren Sialinsäureabkömmligen ebenfalls eine Beteiligung am Proteinexport zukommen könnte.

Die Lokalisation der an der Zuckerkettenreifung beteiligten Enzyme sowie des M6P-Rezeptors innerhalb des Golgi-Komplexes wirft ein weiteres Problem auf: Da die Sialyltransferasen Bestandteile der trans-Golgi-Cysternen sind, das lysosomale M6P-Signal jedoch bereits im cis-Abschnitt fertiggestellt wird und auch M6P-Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen im cis-Teil des Golgi-Apparates nachgewiesen wurden (Brown und Farquhar 1984; Farquhar 1985), könnte ein weiterer Mechanismus erforderlich sein, um den intrazellulären Transport von TG zu Lysosomen zu unterbinden. Eine Möglichkeit bestünde in einem entsprechenden Signal, das von der Struktur des Proteinrückgrates des TG selbst gebildet wird und für den Transfer des TG-Moleküls durch den cis- und Medialbereich des Golgi-Komplexes verantwortlich ist. In den trans-Cysternen könnte dann die erst dort fertiggestellte Signalstruktur der komplexen Kohlenhydratkette wirksam werden. Ihre Bedeutung wäre dann zu relativieren: Möglicherweise fällt ihr in diesem Falle nur die Entscheidung darüber zu, daß das TG nicht basolateral, sondern an der apikalen Plasmamembran exportiert

wird. Die Notwendigkeit für ein zusätzliches Signal für den Transport des TG-Moleküls durch den Golgi-Komplex ist letztlich von der genauen Lokalisation des M6P-Rezeptors innerhalb des Golgi-Komplexes von Thyreozyten abhängig. Vorläufige Resultate zeigen, daß in diesem Zelltyp einer der beiden M6P-Rezeptortypen, der 215kD-Rezeptor (Sahagian et al. 1981), in den trans-Golgi-Cysternen zumindest stark konzentriert, wenn nicht sogar ausschließlich, vorkommt (Scheel und Herzog 1987). Allerdings existieren bisher keine Befunde über die intrazelluläre Verteilung des anderen, kationenabhängigen Rezeptors mit einem Molekulargewicht von 46kD (Hoflack und Kornfeld 1985).

4.4.) Bedeutung der Sulfatierung von Tyrosin

Die Hemmung der Sulfatierung von Tyrosinresten hatte keine Auswirkungen auf den Export von neusynthetisiertem TG. Die Rolle des Tyrosinsulfates ist somit, abgesehen von allgemeinen Funktionen der geladener Gruppen, wie etwa Erhöhung der Löslichkeit oder Stabilisierung bestimmter Konformationen, ungeklärt. Eine für das TG spezifische Funktion der Sulfatierung von Tyrosinresten könnte in der Beeinflussung deren Jodierung bestehen: Die Sulfatierung des TG findet, ebenso wie die Phosphorylierung, intrazellulär statt, also vor der Jodierung der Tyrosinreste an der apikalen Plasmamembran. Nach Hydrolyse von lumenalem TG ließen sich keine sulfatierten Jodtyrosinreste oder Schilddrüsenhormone nachweisen (Scheel und Herzog, unveröffentlicht). Offensichtlich sind also sulfatierte Tyrosinreste von der Jodierung ausgenommen.

4.5.) Funktionelle Implikationen der TG-Struktur

Zur Zeit sehen wir uns mit dem Problem konfrontiert zu verstehen, wie die komplexen Transportwege des TG von seiner Synthese bis zu seiner lysosomalen Degradation reguliert werden. Diese Problematik schließt auch die Frage mit ein, wie ein in seinen Funktionen so vielfältiges Protein wie das TG im Verlauf der Evolution entstanden ist.

Die Struktur des TG-Gens der Ratte (Musti et al. 1986) sowie die Nucleotidsequenz dieses Gens von Rind (Mercken et al. 1985) und Mensch (Malthiery und Lissitzky 1987) sind bekannt.

Der größte Anteil des TG-Moleküls ist demnach aus drei Typen von repetitiven Einheiten aufgebaut, die jeweils in Blöcken angeordnet sind und untereinander keine Homologie aufweisen. Die hormonogenen Tyrosylreste befinden sich außerhalb der repetitiven Einheiten an den beiden Enden der Proteinkette.

Interessanterweise zeigt der carboxyterminale Bereich, der keinem der Blöcke zugehört, starke Homologien (bis zu 64%) mit der Acetylcholinesterase von *Torpedo californica* (Schumacher et al. 1986; Swillens et al. 1986). Dieses Enzym ist mit Membranen assoziiert, ohne aber ein integrales Membranprotein zu sein. Es besteht demnach die Möglichkeit, daß auch TG mittels dieser Domäne mit der Plasmamembran in Kontakt tritt, beispielsweise bei der Jodierungsreaktion oder der Endozytose.

Weiterhin haben Koch et al. (1987) auf die Sequenzhomologie der repetitiven Einheit des TG, die den größten Teil seiner aminoterminalen Hälfte ausmacht, zu einem Protein hingewiesen, das möglicherweise am intrazellulären Transport von class II-Histo-

kompatibilitätsantigenen beteiligt ist.

Nach den vorliegenden Befunden hat sich das TG-Molekül im Verlauf der Evolution durch Fusion von mindestens drei Proteinen völlig unterschiedlicher Herkunft herausgebildet. Es wird interessant sein zu erfahren - etwa über die Analyse klonierter Abschnitte der TG-Kette - , ob auch die verschiedenen Transportfunktionen unterschiedlichen Domänen dieses Proteins zugeordnet werden können.

5.) Z U S A M M E N F A S S U N G

Thyreoglobulin (TG) ist die makromolekulare Vorstufe der Schilddrüsenhormone. Das Molekül setzt sich aus zwei identischen Unter-einheiten zusammen. Ein hochempfindlicher, kolorimetrischer Test erbrachte den Nachweis, daß Schweine-TG ein phosphoryliertes Protein ist und durchschnittlich 6 Phosphatgruppen trägt. Die Phosphorylierung von TG erfolgt intrazellulär, im Golgi-Apparat oder rauhen endoplasmatischem Retikulum. Abbauten mit verschiedenen Endo- und Exoglycosidasen zeigten, daß die mannosereichen und die komplexen Kohlenhydratseitenketten (CHO) des TG jeweils 2 Phosphatreste tragen. Die beiden übrigen Phosphatgruppen sind offenbar an Aminosäuren, wahrscheinlich an Serinreste, gebunden. Ein enzymatisches Nachweisverfahren, dem TG-Hydrolysate unterworfen wurden, wies Mannose-6-Phosphat (M6P) als den phosphorylierten Bestandteil der mannosereichen CHO aus. Dieser Befund wurde bestätigt durch den direkten, dünnschichtchromatographischen Nachweis von M6P nach enzymatischer Abspaltung und Hydrolyse radiophosphorylierter, mannosereicher CHO. Außerdem hatte eine Behandlung der CHO mit alkalischer Phosphatase vor ihrer Hydrolyse einen beträchtlichen Verlust (ca. 50%) an Radioaktivität zur Folge; dies weist darauf hin, daß das M6P in terminaler Bindung vorliegt. Folglich sollte es an zelluläre M6P-Rezeptoren binden und als lysosomales Transportsignal dienen können. Bestätigt wurde diese Annahme durch die Beobachtung, daß durch Zusatz von M6P in das Kulturmedium die Bindung von radiomarkiertem TG an "Chinese hamster ovary" - Zellen kompetitiv gehemmt wurde.

Ein Sialinsäurederivat wurde als phosphorylierter Bestandteil der komplexen CHO identifiziert. Dieser Nachweis erfolgte durch Radiomarkierung, Abspaltung mit Neuraminidase und anschließende dünnschichtchromatographische Auftrennung.

Der Export von TG in das Follikellumen stellt eine unerläßliche Voraussetzung für die Bildung von Schilddrüsenhormonen dar. Nicht bekannt ist bisher, weshalb das M6P-Signal neusynthetisiertes TG nicht auf einer direkten, intrazellulären Route zu Lysosomen transportiert. Es wird vorgeschlagen, daß eine Hierarchie von Transportsignalen auf dem TG-Molekül den einzigartigen Transportweg des TG, der Sekretion, Speicherung und Wiederaufnahme beinhaltet, reguliert. Eine Hemmung der Synthese von Tyrosinsulfat, welches als Exportsignal vorgeschlagen wurde, hatte keine Wirkung auf die Exportrate von TG. Das gesuchte Exportsignal könnte von einem Teil der komplexen CHO gebildet werden; Sialinsäurereste machen möglicherweise einen Bestandteil dieser Signalstruktur aus.

6.) E N G L I S H S U M M A R Y

W. Neumüller: Phosphorylation of thyroglobulin - Detection and possible role in protein transport.

Thyroglobulin (TG), the macromolecular precursor of thyroid hormones, consists of two identical subunits. By means of a highly sensitive, colorimetric phosphate-assay, pig TG was shown to be a phosphorylated protein carrying, on an average, 6 phosphate groups per molecule. Phosphorylation of TG is an intracellular event occurring in the Golgi apparatus or the rough endoplasmic reticulum. Digestion experiments with several endo- or exoglycosidases revealed that the high-mannose and the complex carbohydrate side-chains (CHO) of TG each carry 2 phosphate residues. The remaining two phosphate groups appear to be linked to an amino acid, probably serine. An enzymatic assay applied to hydrolysates of TG showed that the phosphorylated compound of the high-mannose CHO was mannose-6-phosphate (M6P). This was confirmed by direct demonstration of M6P by thin-layer chromatography (t.l.c.) after enzymatic cleavage and hydrolysis of radio-phosphorylated high-mannose CHO. In addition, alkaline phosphatase treatment of CHO prior to hydrolysis resulted in a considerable loss (approx. 50 %) of radioactivity, indicating that the M6P is bound in terminal linkage. It should thus be able to bind to cellular M6P-receptors and serve as a lysosomal transport signal. This assumption was confirmed by the observation that M6P added to the culture media competitively inhibited binding of

radiolabelled TG to Chinese hamster ovary cells. A sialic acid derivative was identified as the phosphorylated constituent of the complex CHO by means of cleavage with neuraminidase and t.l.c. after radiolabelling.

The export of TG into the follicular lumen is an indispensable prerequisite for thyroid hormone formation. It is as yet unknown why the M6P-signal fails to direct newly synthesized TG to lysosomes on a direct, i.e. intracellular route. The results presented here suggest that a hierarchy of transport signals present on the TG molecule regulates its unique pathway of secretion, storage, and recapture. An inhibited synthesis of tyrosine sulphate, which has been proposed to be an export signal, had no effect on the export rate of TG. The export signal sought after may reside in the structure of the complex CHO and involve sialic acid residues.

7.) L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1.) Benson, A.A. (1957):

Sugar Phosphates, paper and column chromatography
Methods Enzymol. **3**, 110-125

2.) Brandley, B.K., Schnaar, R.L. (1985):

Phosphorylation of extracellular carbohydrates by intact
cells
J. Biol. Chem. **260**, 12474-12483

3.) Brown, W.J., Farquhar, M.G. (1984):

The mannose-6-phosphate receptor for lysosomal enzymes is
concentrated in cis Golgi cisternae
Cell **36**, 295-307

4.) Burton, K. (1956):

A study of the conditions and mechanisms of the
diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of
deoxyribonucleic acid
Biochem. J. **62**, 315-323

5.) Chamberlain, J.P. (1979):

Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide
gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate
Analyt. Biochem. **98**, 132-135

6.) Consiglio, E., Acquaviva, A.M., Formisano, S., Liguoro, D.,
Gallo, A., Vittorio, T., Santisteban, P., De Luca, M.,
Shifrin, S., Yeh, H.J.C., Kohn, L.D. (1987):

Characterization of phosphate residues on Thyroglobulin
J. Biol. Chem. **262**, 10304-10314

- 7.) Creek, K.E., Sly, W.S. (1982):
Adsorptive pinocytosis of phosphorylated oligosaccharides by human fibroblasts
J. Biol. Chem. 257, 9931-9937
- 8.) Ekholm, R., Wollman, S.H. (1975):
Site of iodination in the rat thyroid gland deduced from electron-microscopic autoradiographs
Endocrinology 97, 1432-1444
- 9.) Farquhar, M.G. (1985):
Progress in unraveling pathways of Golgi traffic
Ann. Rev. Cell Biol. 1, 447-488
- 10.) Gabel, C.A., Goldberg, D.E., Kornfeld, S. (1982):
Lysosomal enzyme oligosaccharide phosphorylation in mouse lymphoma cells: specificity and kinetics of binding to the mannose 6-phosphate receptor in vivo
J. Cell Biol. 95, 536-542
- 11.) Gawehn, K. (1984):
D-Mannose and D-Mannose 6-Phosphate
In: Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J., Graßl, M. (Hrsg.):
Methods of enzymatic analysis
Verlag Chemie, Weinheim
Vol. 6, 262-267
- 12.) Gottesman, M.M., Sobel, M.E. (1980):
Tumor promoter and Kirsten sarcoma virus increase the synthesis of a secreted glycoprotein by regulating levels of translatable m-RNA
Cell 19, 449-455

- 13.) Gottschalk, A., Ada, G.L. (1956):

The separation and quantitative determination of the
component sugars of mucoproteins

Biochem. J. **62**, 681-686

- 14.) Greengard, P. (1978):

Phosphorylated proteins as physiological effectors -

Protein phosphorylation may be a final common pathway for
many biological regulatory agents.

Science **199**, 146-152

- 15.) Haeberli, A., Millar, F.K., Wollman, S.H. (1978)

Accumulation and localization of radiocalcium in the rat
thyroid gland

Endocrinology **102**, 1511-1519

- 16.) Heil, A., Zillig, W. (1970):

Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase
from isolated subunits as a tool for the elucidation of the
role of the subunits in transcription

FEBS Lett. **11**, 165-168

- 17.) Herzog, V. (1983a):

Transcytosis in thyroid follicle cells

J. Cell Biol. **97**, 607-617

- 18.) Herzog, V. (1983b):

Preparation of inside-out thyroid follicles for studies on
transcellular transport

Methods Enzymol. **98**, 447-458

- 19.) Herzog, V. (1985a)

Secretion of sulfated and phosphorylated thyroglobulin in vivo and in vitro. I. Incorporation of $^{35}\text{-SO}_4$ into thyroglobulin

Eur. J. Cell Biol. **36**, Suppl. 7, 26

- 20.) Herzog, V. (1985b):

Secretion of sulfated thyroglobulin

Eur. J. Cell Biol. **39**, 399-409

- 21.) Herzog, V., Miller, F. (1972):

The localization of endogenous peroxidase in the lacrimal gland of the rat during postnatal development. Electron microscope cytochemical and biochemical studies.

J. Cell Biol. **53**, 662-680

- 22.) Herzog, V., Neumüller, W., Holzmann, B. (1987):

Thyroglobulin, the major and obligatory exportable protein of thyroid follicle cells, carries the lysosomal recognition marker mannose-6-phosphate

EMBO J. **6**, 555-560

- 23.) Hille, A., Rosa, P., Huttner, W.B. (1984):

Tyrosine sulphation: a posttranslational modification of proteins destined for secretion?

FEBS Lett. **177**, 129-134

- 24.) Hoflack, B., Kornfeld, S. (1985):

Purification and characterization of a cation-dependent mannose 6-phosphate receptor from murine P 338 D₁ macrophages and bovine liver

J. Biol. Chem. **260**, 12008-12014

- 25.) Holzmann, B., Johnson, J.P., Kaudewitz, P., Riethmüller, G.
(1985):
In situ analysis of antigens on malignant and benign cells
of the melanocyte lineage - Differential expression of two
surface molecules, gp75 and p89
J. Exp. Med. **161**, 366-377
- 26.) Ishihara, N., Nagao, K., Kobayashi, B. (1985):
Tyrosine phosphorylation of platelet protein induced by
phorbol ester
Thrombosis and Haemostasis **54**, 579-585
- 27.) Kaplan, A., Achord, D.T., Sly, W.S. (1977):
Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are
recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts
PNAS **74**, 2026-2030
- 28.) Karnovsky, M.J. (1965):
A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality
for use in electron microscopy
J. Cell Biol. **27**, 137 A
- 29.) Koch, N., Lauer, W., Habicht, J., Dobberstein, B. (1987):
Primary structure of the gene for the murine Ia antigen-
associated invariant chains (Ii). An alternatively spliced
exon encodes a cysteine-rich domain highly homologous to a
repetitive sequence of thyroglobulin
EMBO J. **6**, 1677-1683
- 30.) Kornfeld, S. (1986):
Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease
states
J. Clin. Invest. **77**, 1-6

- 31.) Laemmli, U.K. (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4

Nature **227**, 680-685

- 32.) Leroy, J.G., DeMars R.I. (1967):

Mutant enzymatic and cytological phenotypes in cultured human fibroblasts

Science **157**, 804-806

- 33.) Malthiery, Y., Lissitzky, S. (1987):

Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8448-base complementary DNA

Eur. J. Biochem. **165**, 491-498

- 34.) Martensen, T.M. (1982):

Phosphotyrosine in proteins - Stability and quantification

J. Biol. Chem. **257**, 9648-9652

- 35.) Mercken, L., Simons, M.-J., Swillens, S., Massaer, M.,

Vassart, G. (1985):

Primary structure of bovine thyroglobulin deduced from the sequence of its 8,431-base complementary DNA

Nature **316**, 647-651

- 36.) Monaco, F., Robbins, J. (1973):

Defective thyroglobulin synthesis in an experimental rat thyroid tumor - Lack of membrane-bound sialyltransferase activity

J. Biol. Chem. **248**, 2328-2336

- 37.) Munro, S., Pelham, H.R.B. (1987):

A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins

Cell **48**, 899-907

- 38.) Muramatsu, T., Koide, N., Ceccarini, C., Atkinson, P.H. (1976):

Characterization of mannose-labeled glycopeptides from human diploid cells and their growth-dependent alterations

J. Biol. Chem. **251**, 4673-4679

- 39.) Muramatsu, T., Koide, N., Maeyama, K. (1978):

Further studies on endo- β -N-acetyl-glucosaminidase D

J. Biochem. **83**, 363-370

- 40.) Musti, A.M., Avvedimento, E.V., Polistina, C., Ursini, V.M., Obici, S., Nitsch, L., Cocozza, S., Di Lauro, R. (1986):

The complete structure of the rat thyroglobulin gene

PNAS **83**, 323-327

- 41.) Natowicz, M., Hallett, D.W., Frier, C., Chi, M., Schlesinger, P.H., Baenziger, J.U. (1983):

Recognition and receptor-mediated uptake of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides by cultured human fibroblasts

J. Cell Biol. **96**, 915-919

- 42.) Neumüller, W., Herzog, V. (1985):

Secretion of sulfated and phosphorylated thyroglobulin in vivo and in vitro. II. Phosphorylation of thyroglobulin

Eur. J. Cell Biol. **36**, Suppl. 7, 47

- 43.) Neumüller, W., Herzog, V. (1986):
Presence of exposed mannose-6-phosphate on pig thyroglobulin
Acta Biol. Hung. **37**, 137
- 44.) Robbins, P.W., Hubbard, S.C., Turco, S.J., Wirth, D.F.
(1977):
Proposal for a common oligosaccharide intermediate in the
synthesis of membrane glycoproteins
Cell **12**, 893-900
- 45.) Roitt, I.M., Torrigani, G. (1967):
Identification and estimation of undegraded thyroglobulin in
human serum
Endocrinology **81**, 421-429
- 46.) Rolland, M., Lissitzky, S. (1976):
Endogenous proteolytic activity and constituent polypeptide
chains of sheep and pig 19 S thyroglobulin
Biochim. Biophys. Acta **427**, 696-707
- 47.) Sahagian, G.G., Distler, J., Jourdian, G.W. (1981):
Characterization of a membrane-associated receptor from
bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine
testicular β -galactosidase
PNAS **78**, 4289-4293
- 48.) Sahagian, G.G., Gottesman, M.M. (1982):
The predominant secreted protein of transformed murine
fibroblasts carries the lysosomal mannose-6-phosphate
recognition marker
J. Biol. Chem. **257**, 11145-11150

- 49.) Schauer, R. (1985):
Sialic acids and their role as biological masks
TIBS 10, 357-360
- 50.) Scheel, G., Herzog, V. (1987):
Detection and localization of the mannose-6-phosphate
receptor in thyroid follicle cells: Implications for the
transport of thyroglobulin
Eur. J. Cell Biol. 43, Suppl. 17, 50
- 51.) Schumacher, M., Camp, S., Maulet, Y., Newton, M., MacPhee-
Quigley, K., Taylor, S.S., Friedmann, T., Taylor, P. (1986):
Primary structure of Torpedo californica acetylcholin-
esterase deduced from its cDNA sequence
Nature 319, 407-409
- 52.) Smeds, S. (1972):
A microgel electrophoretic analysis of the colloid proteins
in single rat thyroid follicles
Endocrinology 91, 1300-1306
- 53.) Spiro, M.J., Gorsky, K.M. (1986):
Studies on the posttranslational migration and processing of
thyroglobulin: use of inhibitors and evaluation of the role
of phosphorylation
Endocrinology 119, 1146-1158
- 54.) Spiro, R.G., Spiro, M.J. (1966):
Glycoprotein Synthesis: Studies on thyroglobulin
J. Biol. Chem., 241, 1271-1282

- 55.) Swillens, S., Ludgate, M., Mercken, L., Dumont, J.E.,
Vassart, G. (1986):
Analysis of sequence and structure homologies between
thyroglobulin and acetylcholinesterase: possible functional
and clinical significance
Biochem. Biophys. Res. Commun. **137**, 142-148
- 56.) Tarentino, A.L., Plummer, T.H., Maley, F. (1974):
The release of intact oligosaccharides from specific
glycoproteins by endo- β -N-acetylglucosaminidase H
J. Biol. Chem. **249**, 818-824
- 57.) Tsuji, T., Yamamoto, K., Irimura, T., Osawa, T. (1981):
Structure of carbohydrate unit A of porcine thyroglobulin
Biochem. J. **195**, 691-699
- 58.) Westheimer, F.H. (1987)
Why nature chose phosphates
Science, **235**, 1173-1178
- 59.) Widnell, C.C. (1974):
Purification of rat liver 5'-nucleotidase as a complex with
sphingomyelin
Methods Enzymol. **32**, 368-374
- 60.) Wollman, S.H. (1969):
Secretion of thyroid hormones
In: Dingle, J.D., Fell, H.B. (Hrsg.):
Lysosomes in biology and pathology
North Holland Publishing Company, Amsterdam
Vol. **2**, 483-512

- 61.) Yamamoto, K., Tsuji, T., Irimura, T., Osawa, T. (1981):
The structure of carbohydrate unit B of porcine
thyroglobulin
Biochem. J. **195**, 701-713
- 62.) Yamamoto, K., Tsuji, T., Tarutani, O., Osawa, T. (1984):
Structural changes of carbohydrate chains of human
thyroglobulin accompanying malignant transformations of
thyroid glands
Eur. J. Biochem. **143**, 133-144
- 63.) Yamamoto, K., Tsuji, T., Tarutani, O., Osawa, T. (1985):
Phosphorylated high mannose-type and hybrid-type
oligosaccharide chains of human thyroglobulin isolated from
malignant thyroid tissue
Biochim. Biophys. Acta **838**, 84-91

D A N K S A G U N G E N

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. V. Herzog für die Themenstellung und die Überlassung des Arbeitsplatzes, sowie für die vielfältigen Anregungen, Hilfen und kritischen Diskussionen im Verlauf dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Cleve möchte ich mich herzlich für die Betreuung der Arbeit innerhalb der Fakultät für Biologie bedanken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Zellbiologie danke ich für die gute Zusammenarbeit und bereitwillige Unterstützung. Namentlich erwähnen möchte ich: Maria Eschrich, Sabine Fuchs (Isotopenlabor), Josef Grimm (Reparaturen und Gerätebau), Karin Hrubesch und Doris Wolfram (Schneidelabor), Käthe Rauert (Zellkultur) und Ulrike Reinhardt (Biochemisches Labor).

Besonderer Dank gebührt Frau Eva-Maria Praetorius für die schnelle und sorgfältige Anfertigung der photographischen Aufnahmen.

Schließlich möchte ich noch all denjenigen Wissenschaftlern meinen Dank abstaten, die durch ihre praktische Mithilfe, die großzügige Überlassung von Materialien oder durch hilfreiche Ratschläge zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Dr. A.P. Corfield (Bristol), Dr. B. Holzmann (z.Zt. Stanford), Dr. A. Kaplan (St. Louis), Dr. G. Reuter (Kiel), Prof. Dr. R. Schauer (Kiel) und Dr. C.C. Widnell (Pittsburgh).

LEBENS LAUF

Name: Wolfgang Neumüller

Geburtsdatum: 15. September 1958

Geburtsort: Bad Reichenhall

Eltern: Neumüller, Werner und Inge,
geb. Labudda

Schul Ausbildung: 1964 - 1968 Volksschule St. Konrad,
Ingolstadt
1968 - 1972 Christoph - Scheiner -
Gymnasium, Ingolstadt
1972 - 1978 Apian - Gymnasium, Ingolstadt
1978 Abitur

Studium: seit WS 1978/79: Studium der Biologie an der
Ludwig - Maximilians - Universität, München;
1985: Diplom

Dissertation: seit 1984 am Institut für Zellbiologie
(Fakultät für Medizin) der
Ludwig Maximilians - Universität, München

